



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

Sofia Vilaça Nora

**Cariossistemática do género *Calendula* L.
(ASTERACEAE) na Península Ibérica**



Sofia Vilaça Nora

**Cariossistemática do género *Calendula* L.
(ASTERACEAE) na Península Ibérica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia, Biodiversidade e Gestão de Ecossistemas, realizada sob a orientação científica do Doutor Paulo Silveira, Professor auxiliar e da Doutora Conceição Santos, Professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof.^a Dr.^a Maria Helena Abreu Silva

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Dr. Jorge Américo Rodrigues Paiva

investigador principal aposentado do Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

co-orientador

Prof.^a Dr.^a Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos

professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

orientador

Prof. Dr. Paulo Cardoso da Silveira

professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos orientadores, Professor Paulo Silveira e Professora Conceição Santos, pelo apoio, incentivo, envolvimento, críticas, sugestões e constante disponibilidade.

Ao João Loureiro e à Sílvia Castro, pelo contributo fundamental que deram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Eleazar Rodríguez e à Helena Oliveira pela ajuda com a citometria de fluxo.

Ao Miguel Sequeira do Departamento de Biologia da Universidade da Madeira pelos aquénios de *C. incana* subsp. *maderensis*.

À Lísia Lopes pelo auxílio na fase inicial da elaboração de preparações para os estudos cariológicos.

Ao Abelardo Aparício do Departamento de Ecologia e Biologia Vegetal da Universidade de Sevilha, pela sua disponibilidade em partilhar comigo os truques da cariologia.

À minha família, em especial aos meus pais, pela oportunidade que me deram, pelo apoio e carinho incondicional e à minha avó, por me ter transmitido, desde cedo, a sua paixão pela botânica.

Ao André Soukiazes, pela companhia e paciência no trabalho de campo, pelo apoio e incentivo.

palavras-chave

Calendula; cariologia, número cromossomático; citometria de fluxo; conteúdo em ADN nuclear; Península Ibérica.

resumo

O género *Calendula* L. pertence à tribo *Calenduleae* Cass., a tribo mais pequena da família Asteraceae. Ocorre essencialmente na bacia do Mediterrâneo e possui entre 10 a 25 espécies, dependendo do tratamento taxonómico. Devido à grande variabilidade morfológica dos *taxa* que constituem este género, a sua taxonomia tem-se revelado difícil. Foi demonstrado que as análises kariológicas são uma ferramenta importante na resolução da taxonomia de géneros complexos. Em *Calendula*, a informação kariológica encontra-se dispersa, fragmentada, e é frequentemente contraditória. Assim, de forma a reunir informação citológica consistente que permita consolidar o conhecimento existente do género e que forneça bases para uma revisão taxonómica no âmbito da Flora Ibérica, este estudo tem como objectivo: i) determinar o número cromossomático e ii) estimar, pela primeira vez, o conteúdo em ADN nuclear de vários *taxa* do género *Calendula*. Este estudo integra 11 *taxa* que ocorrem na Península Ibérica (*C. arvensis* subsp. *arvensis*, *C. arvensis* subsp. *macroptera*, *C. incana* subsp. *incana*, *C. incana* subsp. *algarbiensis*, *C. incana* subsp. *maderensis*, *C. incana* subsp. *microphylla*, *C. officinalis*, *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii*, *C. suffruticosa* subsp. *greuteri*, *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* e *C. tripterocarpa*). O conteúdo em ADN nuclear foi determinado por citometria de fluxo e as contagens cromossomáticas foram efectuadas através da técnica de esmagamento (*squash*), em ápices radiculares e botões florais. Neste estudo foram observados os números cromossomáticos de $2n = 44$ para *C. arvensis*, $2n = 30$ para *C. tripterocarpa* e $2n = 32$ para *C. incana* subsp. *microphylla*, *C. officinalis* e *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica*. Observou-se que os *taxa* anuais de *Calendula* possuem conteúdos em ADN nuclear bastante distintos entre si, embora o tamanho do genoma monoploide nestes seja significativamente inferior aos dos *taxa* perenes. *C. incana* e *C. suffruticosa* possuem um conteúdo em ADN nuclear relativamente semelhante, no entanto, observaram-se dois *taxa*, *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii* e *C. suffruticosa* subsp. *greuteri*, da região oriental da Península Ibérica com valores superiores aos encontrados nos outros *taxa* perenes. Este estudo pretende contribuir para uma melhor compreensão das relações kariológicas e taxonómicas entre os *taxa* que ocorrem na Península Ibérica de forma a fornecer bases sólidas para a correcta classificação do género.

keywords

Calendula; cariology; chromosome number; flow cytometry; nuclear DNA content; Iberian Peninsula.

abstract

The genus *Calendula* L. belongs to Calenduleae Cass., the smallest tribe of Asteraceae. It occurs in the Mediterranean region and comprises 10 to 25 species, depending on the taxonomic treatment. Due to its high morphological variation, *Calendula* is a taxonomically difficult genus. Karyologic analyses have been demonstrated to be an important tool for the taxonomy of complex groups. However, karyologic information within *Calendula* is scattered, fragmented and often contradictory. Therefore, in order to gather consistent cytological information that will enable to consolidate the existing knowledge and sustain a taxonomic revision of the genus within the scope of Flora Iberica, we propose to: i) determine the chromosome number, and ii) estimate, for the first time, the genome size of the Iberian Peninsula representatives of this genus. This study includes 11 *taxa* that occur in the Iberian Peninsula (*C. arvensis* subsp. *arvensis*, *C. arvensis* subsp. *macroptera*, *C. incana* subsp. *incana*, *C. incana* subsp. *algarbiensis*, *C. incana* subsp. *maderensis*, *C. incana* subsp. *microphylla*, *C. officinalis*, *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii*, *C. suffruticosa* subsp. *greuteri*, *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* and *C. tripterocarpa*). In this study we reported the chromosomal number $2n = 44$ for *C. arvensis*, $2n = 30$ for *C. tripterocarpa* and $2n = 32$ for *C. incana* subsp. *microphylla*, *C. officinalis* and *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica*. The content in nuclear DNA was determined by flow cytometry and chromosome counts were made using squash technique in root tips and flower buds. We observed within *Calendula* annual *taxa* different DNA nuclear contents and significant lower C-values when comparing to perennial *taxa*. *C. incana* and *C. suffruticosa* have a relatively similar nuclear DNA content. However, we found two *taxa*, *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii* and *C. suffruticosa* subsp. *greuteri*, in the east of the Iberian Peninsula, with higher c-values than the ones found in other perennial *taxa*. Furthermore, we believe that this study will enable to gather important clues on the evolutionary relationships among the species of *Calendula*.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABELAS.....	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
CAPÍTULO 1. Introdução.....	5
1.1. Enquadramento do estudo	5
1.2. Objectivos	5
1.3. Género <i>Calendula</i> L.....	6
1.3.1. Tribo Calenduleae	6
1.3.3. Heterocarpia.....	11
1.3.4. Relações intra-específicas em <i>Calendula</i> L.	13
1.3.5. Números cromossómicos nos <i>taxa</i> da Península Ibérica.....	15
1.4. Número Cromossómico.....	21
1.5. Análise do conteúdo em ADN nuclear	25
CAPÍTULO 2. Material e Métodos.....	30
2.1. Material vegetal	30
2.2. Índice mitótico.....	31
2.3. Determinação do número cromossómico.....	33
2.4. Determinação do conteúdo em ADN nuclear	34
2.5. Análise estatística	36
CAPÍTULO 3. Resultados	37
3.1. Índice mitótico.....	37
3.2. Número cromossómico	38
3.3. Conteúdo em ADN nuclear	41
CAPÍTULO 4. Discussão	48
4.1. Índice mitótico.....	48
4.2. Número cromossómico	48
4.3. Conteúdo em ADN nuclear	48
4.4. Considerações finais	53
CAPÍTULO 5. Referências Bibliográficas	55
ANEXO.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Filogenia da tribo Calenduleae, cladograma obtido após análise estatística de caracteres morfológicos, citológicos e químicos (Nordenstam 1996).

Figura 2- Esquema filogenético da Tribo Calenduleae proposto por Norlindh (1946).

Figura 3- Distribuição do género *Calendula* L. na bacia do Mediterrâneo (Norlindh 1946).

Figura 4- Inflorescências de *C. incana* Willd. subsp. *microphylla* (Lange) Ohle, *C. incana* Willd. subsp. *algarbiensis* (Boiss.) Ohle, *C. suffruticosa* Vahl. subsp. *carbonellii* Ohle e *C. officinalis* L..

Figura 5- Morfologia dos aquénios de *Calendula arvensis* L.: A. rostrado, B. cimbiforme e C. anular (Adaptado de Ruiz de Clavijo 2005).

Figura 6- Infrutescência de *Calendula tripterocarpa* Rupr. e *Calendula officinalis* L.

Figura 7- Esquema explicativo proposto por Heyn & Joel (1983) para o processo de especiação em *Calendula* L. baseado no padrão de hibridização e combinação e duplicação dos números cromossómicos.

Figura 8- Esquema do método descrito por Galbraith *et al.* (1983) para a obtenção de núcleos individualizados em suspensão para FCM (Loureiro & Santos 2004).

Figura 9- Localização das populações estudadas na Península Ibérica e Arquipélago da Madeira.

Figura 10- Números cromossómicos em *Calendula* spp. A-C. Placas metafásicas com cromossomas corados com carmin clorídrico alcoólico, *Calendula arvensis*, $2n = 44$ (A), *Calendula officinalis*, $2n = 32$ (B), *Calendula incana* subsp. *microphylla*, $2n = 32$ (C), *Calendula suffruticosa* subsp. *lusitanica*, $2n = 32$ (D) e *Calendula tripterocarpa*, $2n = 30$ (E). F. Célula de *Calendula suffruticosa* subsp. *lusitanica* em diacinese ($n = 16$).

Figura 11- Histogramas de fluorescência obtidos através da análise silmultânea de núcleos isolados de *Calendula* spp. e de *Pisum sativum* cv. Ctirad ($2C = 9,09$ pg de ADN, padrão de referência interno): A. *C. arvensis* ($2n = 44$), B. *C. incana* subsp. *microphylla* ($2n = 32$), C. *C. officinalis* ($2n = 32$), D. *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* ($2n = 32$) e E. *C. tripterocarpa* ($2n = 30$).

Figura 12- Esquema explicativo do processo de especiação em *Calendula* L. Os *taxa* contemplados neste estudo estão a laranja, os números correspondem ao número cromossómico diplóide ($2n$), ao lado do nome de cada *taxa* encontra-se o valor do seu conteúdo em ADN nuclear ($2C$ em pg). Esquema adaptado de Heyn & Joel (1983).

Figura 13- Representação gráfica do conteúdo em ADN nuclear das espécies com o número cromossómico $2n = 32$: *C. suffruticosa*, *C. incana* e *C. officinalis*.

Figura 14- Representação gráfica do conteúdo em ADN nuclear dos *taxa* anuais de *Calendula* L..

Figura 15- Representação gráfica do conteúdo em ADN nuclear dos *taxa* *Calendula incana* e *Calendula suffruticosa*.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Lista dos *taxa* pertencentes a *Calendula* L. estudados, com respectiva indicação da localização, data de colheita, nome do colector e número de herbário (AVE) das populações estudadas.

Tabela 2- Variação da actividade mitótica (%) em *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica*.

Tabela 3- Números cromossómicos em *Calendula*: número cromossómico observado neste estudo e valores reportados com respectivas referências.

Tabela 4- Conteúdo em ADN nuclear em *Calendula* spp.

Tabela 5- Conteúdo em ADN nuclear em populações de *Calendula arvensis*.

Tabela 6- Tamanho do genoma holoploide (2C) e monoploide (Cx) em *Calendula* spp.

Tabela 7- Conteúdo em ADN nuclear de *Calendula incana* e *Calendula suffruticosa*.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN- ácido desoxirribonucleico;

ARN- ácido ribonucleico;

AVE- Herbario da Universidade de Aveiro;

BE- brometo de etídio;

bp- pares de base;

CV- coeficiente de variação;

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético;

FCM- citometria de fluxo;

GPB- tampão para uso geral (do inglês *General purpose buffer*);

HCl- ácido clorídrico;

IP- iodeto de propídio;

pg- picogramas;

PVP- *polyvinyl pyrrolidone*;

WPB- tampão para plantas lenhosas (do inglês *Woody Plant Buffer*).

CAPÍTULO 1. Introdução

1.1. Enquadramento do estudo

Este estudo tem como objectivo principal fornecer informação de base, essencial à revisão taxonómica do género *Calendula* L., a realizar por Paulo Silveira (CESAM & Departamento de Biologia de Universidade de Aveiro, Portugal) e Santiago Castroviejo (Real Jardín botánico de Madrid, CSIC, Espanha), no âmbito da elaboração da Flora Ibérica (*Flora Iberica - Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*; <http://www.floraiberica.es>).

Flora Iberica é um projecto impulsionado pelo Real Jardín Botánico de Madrid (CSIC; Espanha) que possui colaboradores de várias instituições científicas de sete países distintos, incluindo Portugal. Teve início em 1980 e até ao momento já foram publicados 14 volumes dos 21 propostos. Esta obra pretende sintetizar os conhecimentos actuais sobre as plantas vasculares espontâneas da Península Ibérica e Ilhas Baleares, facilitando a sua identificação e fornecendo o nome científico considerado correcto, sinónimos, uma descrição morfológica, do habitat, a distribuição geográfica, o período de floração, o número cromossómico, os nomes vernáculos, os usos mais comuns e uma ilustração.

1.2. Objectivos

Este estudo tem como objectivos: i) determinar do número cromossómico dos vários *taxa* existentes na Península Ibérica, tendo como base determinações taxonómicas credíveis, e confrontar os resultados obtidos com a bibliografia existente até à data; ii) estimar pela primeira vez o conteúdo em ADN nuclear em *Calendula* L. através de citometria de fluxo. Pretendendo, desta forma, reunir informação citológica consistente que permita consolidar o conhecimento existente das relações taxonómicas entre os *taxa* que ocorrem na Península Ibérica e fornecer bases sólidas para uma revisão taxonómica aprofundada do género *Calendula* L.

1.3. Género *Calendula* L.

1.3.1. Tribo Calenduleae

A família Asteraceae (também conhecida por Compositae) é uma das maiores e mais bem sucedidas famílias de Angiospermae (Mehra *et al* 1965, Gupta 1969). Possui cerca de 25000 espécies distribuídas por 1100 géneros (Heywood 1993). Esta família cosmopolita abarca plantas muito diversificadas, incluindo géneros deficientemente conhecidos e de taxonomia complexa (Cronquist 1981).

Cassini em “*Dictionnaire des Sciences Naturelles XX*” (1821), estudando as características dos estames e dos estiletes em Asteraceae, dividiu a família em 20 tribos, entre as quais Calenduleae. Desde a sua formação, Calenduleae foi sujeita a diversas alterações. Lessing (1832) reduziu Calenduleae a uma subtribo do grupo Cynareae, remodelando-a de forma a apenas restar o género *Calendula* do grupo originalmente criado por Cassini (que inicialmente reconheceu 9 géneros), porém acrescentou 2 novos géneros *Tripteris* e *Oligocarpus* (Norlindh 1977). De Candolle (1836-1838), por sua vez, criou uma subtribo dentro do grupo Cynarea denominada Calendulaceae onde se encontrava a divisão Calenduleae composta pelos géneros *Calendula*, *Tripteris* e *Oligocarpus*. De Candolle teve particular importância em *Calendula* pois fincou, na altura, a actual distribuição exclusivamente mediterrânea deste género. Até à data, *Calendula* continha espécies sul-africanas, as quais foram transferidas por De Candolle para os géneros *Dimorphotheca*, *Tipteris* e *Osteospermum*. A característica distintiva de *Calendula* em relação aos géneros sul-africanos (principalmente de *Osteospermum* que na altura estava incluído em *Oligocarpus*) é a presença de aquénios internos anulados extremamente encurvados, o que de facto é uma diferença mínima. Harvey (1865) transferiu a sub-tribo para o grupo Senecionideae adicionando dois novos géneros *Dimorphotheca* e *Xenismia*. Com Bentham (1873), Calenduleae voltou de novo à categoria de tribo, reduzindo a família Asteraceae a 13 tribos, número que mantém até à actualidade (Norlindh 1977).

Contrariamente, o número de géneros pertencentes à, novamente, tribo Calenduleae variou bastante ao longo do tempo. Norlindh (1946) divide a tribo em 6 géneros: *Dimorphotheca* Vaill. ex Much, *Castalis* Cass., *Osteospermum* L., *Calendula* L.,

Gibbaria Cass. e *Chrysanthemoides* Tourn. Ex Fabr.. Mais recentemente, Nordenstam (1994), numa revisão da tribo baseada em caracteres morfológicos, citológicos e químicos, agrupa alguns géneros e divide outros. Desta revisão resultou a divisão da tribo Calenduleae em 8 géneros, incluindo cerca de 110 espécies: *Calendula* L., *Chrysanthemoides* Fabr., *Dimorphotheca* Moench, *Garuleum* Cass., *Gibbaria* Cass., *Oligocarpus* Less., *Osteospermum* L. e *Tripteris* Less (Figura 1).

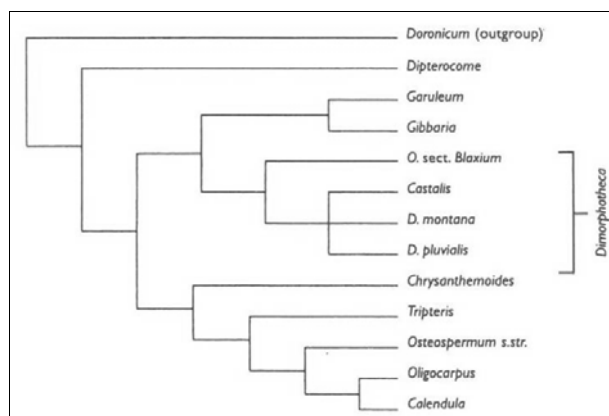


Figura 1- Filogenia da tribo Calenduleae, cladograma obtido após análise estatística de caracteres morfológicos, citológicos e químicos (Nordenstam 1996).

A tribo Calenduleae encontra-se distribuída por África, centro e sul da Europa, Macaronésia e sudoeste da Ásia (Nordenstam 1994). Possui dois grandes centros de distribuição: um centro mediterrâneo, no qual o género *Calendula* se encontra essencialmente distribuído e um centro sul-africano, onde todos os géneros da tribo Calenduleae se encontram representados com a excepção de *Calendula* (Norlindh 1946). Este autor crê que estas duas regiões já estiveram ligadas, formando uma grande e contínua área no Terciário, no entanto, actualmente apenas existem algumas populações relíquia resultantes dessa antiga conexão entre os centros. Apenas as espécies *Osteospermum vaillantii*, *O. monocephalum* e *Chrysanthemoides monilifera* servem de conectoras entre estas duas grandes regiões (Norlindh 1946).

Esta tribo é caracterizada, essencialmente, pela ausência de brácteas interflorais e de papilho nos aquénios (Norlindh 1977). No entanto, indivíduos pré-Calenduleae estavam munidos destes caracteres, ainda é possível observar vestígios rudimentares em alguns indivíduos. Porém estes dois caracteres sofreram reduções graduais que conduziram ao seu desaparecimento completo ou quase completo (Norlindh 1946). A elevada

heterocarpia existente em vários *taxa* de Calenduleae é também uma característica peculiar e interessante que, apesar de existir em outros géneros, é mais acentuada em *Oligocarpus* e *Calendula* (Nordenstam 1994). Os frutos de *Chrysanthemoides* também são surpreendentes, uma vez que são drupas, o que é extremamente raro em Asteraceae (Norlindh 1946).

Relativamente à taxonomia, o género *Calendula* é particularmente complexo (Heyn & Joel, 1983), o número de *taxa* que contém ainda não é claro e existem diversas opiniões, frequentemente contrárias, sobre o estatuto dos *taxa* existentes. As espécies sul-africanas são menos controversas, porém, também existem algumas dificuldades na atribuição do género à qual pertencem (Nordenstam 1994). No entanto, é notório que o género *Calendula* representa uma linha evolutiva especial dentro da tribo Calenduleae. Este género apresenta um centro de desenvolvimento no Mediterrâneo (provavelmente na região de Marrocos, Argélia e Tunísia), o que o distancia dos outros géneros, existindo apenas algumas espécies de *Osteospermum* que conseguem estabelecer contacto com a região mais a sul da distribuição de *Calendula*. Supõe-se que o género *Calendula* terá resultado da evolução gradual de algumas populações primitivas de *Dimorphotheca* localizadas na região mediterrânea (Figura 2), no sentido da redução dos pistilos das flores do disco (Norlindh 1946). *Dimorphotheca* é considerado o grupo mais primitivo da tribo, apresentando capítulos com flores hermafroditas, carácter primitivo nas Asteraceae (Norlindh 1977).

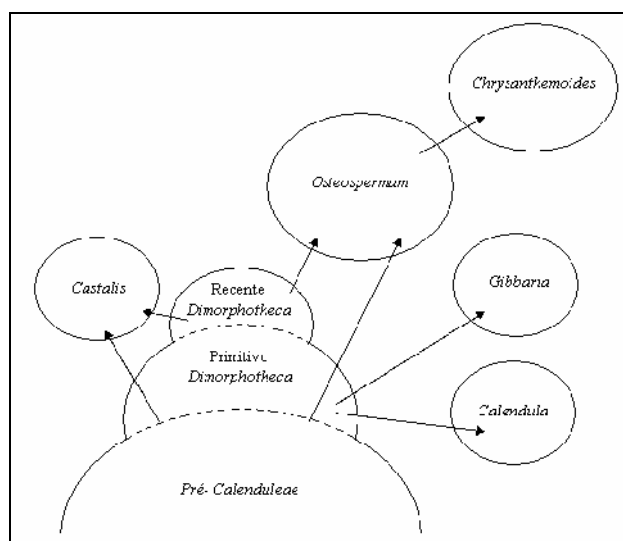


Figura 2- Esquema filogenético da Tribo Calenduleae (Adaptado de Norlindh 1946).

1.3.2. Distribuição e descrição

O género *Calendula*, descrito por Lineu em “*Species Plantarum*” (1753), encontra-se distribuído essencialmente na bacia do Mediterrâneo (Figura 3). Estende-se a norte até à Europa central (até meio de França, sul de Alemanha) e a sul até às montanhas Ahaggar (Hoggar) da Argélia no Sahara e Yemen, desde as ilhas da Macarronésia (Açores, Madeira e Canárias) a ocidente até à costa sudoeste do mar Cáspio, Irão no oriente (Norlindh 1946).



Figura 3- Distribuição do género *Calendula* L. na bacia do Mediterrâneo (Norlindh 1946).

Este género (Figura 4) é constituído por plantas anuais e perenes, com folhas sésseis, dispostas alternadamente, inteiras ou dentadas, por vezes glandulares e aromáticas. Apresenta capítulos solitários, pedunculados, radiados e heterogâmicos, com flores internas tubulares, amarelas, laranja, castanhas ou violeta-púrpura, funcionalmente masculinas e flores externas liguladas, amarelas ou laranja, femininas e férteis. Os capítulos possuem um involúcro campanulado ou hemisférico, com brácteas subiguais dispostas em uma ou duas filas e um receptáculo floral plano e desprovido de brácteas interflorais. Os aquénios desenvolvidos não possuem papilho e são heteromórficos, podendo ser divididos no mínimo em três tipos distintos: aquénios mais externos, corniculados, curvados ou patentes; aquénios médios, naviculares, às vezes triangulares, apiculados ou não e aquénios internos, anulares, ganchudos, tuberculados, dorsalmente rugosos (Nordenstam 1994).



Figura 4- Inflorescências de *C. incana* Willd. subsp. *microphylla* (Lange) Ohle, *C. incana* Willd. subsp. *algarbiensis* (Boiss.) Ohle, *C. suffruticosa* Vahl. subsp. *carbonellii* Ohle e *C. officinalis* L..

As espécies deste género estão adaptadas a diversas formas de dispersão, através do vento (anemocoria), por animais (epizoocoria) não intencionalmente (Heyn & Joel 1983, Gardocki *et al.* 2000, Ruiz de Clavijo 2005), pássaros (Nordenstam 1994) e formigas (Ruiz de Clavijo 2005).

Todos os tipos morfológicos apresentam dormência, o que indica a provável existência de um banco de sementes no solo (Ruiz de Clavijo 2005). De facto, algumas populações, como a de *C. suffruticosa* subsp. *greuteri* do Sul de Espanha, sobrevivem através da existência de um banco de sementes (Silveira, não publicado).

Até à data nenhum estudo foi realizado sobre a predação dos aquénios, embora já tenha sido observada a predação de aquénios de *C. arvensis* por roedores. Desconhece-se, portanto, o seu impacto na capacidade de estabelecimento de novas populações ou da manutenção das existentes, sobretudo em espécies anuais onde esta capacidade se torna fundamental, devido à curta duração do seu ciclo de vida.

O único estudo conhecido que identifica os agentes polinizadores do género *Calendula* foi realizado por Ruiz de Clavijo (2005) onde foi observado a visita de insectos generalistas (*Systropha* spp., *Usia* spp., *Melanothrips* spp., *Euryderma ornata* L. e *Psilotrix nobilis* Redtenbacher) a flores de *C. arvensis*.

1.3.3. Heterocarpia

A produção de mais de um tipo de fruto por planta, denominada por heterocarpia, é uma estratégia reprodutiva muitas vezes encontrada em espécies da família Asteraceae. O polimorfismo dos frutos pode ser observado na variação na forma, tamanho ou massa (Ruiz de Clavijo 2005). O género *Calendula* é reconhecido pela enorme diversidade de aquénios existentes no mesmo capítulo (Figura 5). No mesmo capítulo, é possível observar uma série contínua de morfologias (Figura 6) que reflectem uma evolução de formas mais primitivas na periferia (aquénios cimbiformes e rostrados), para formas mais avançadas no interior (aquénios anulares) (Norlindh 1946).

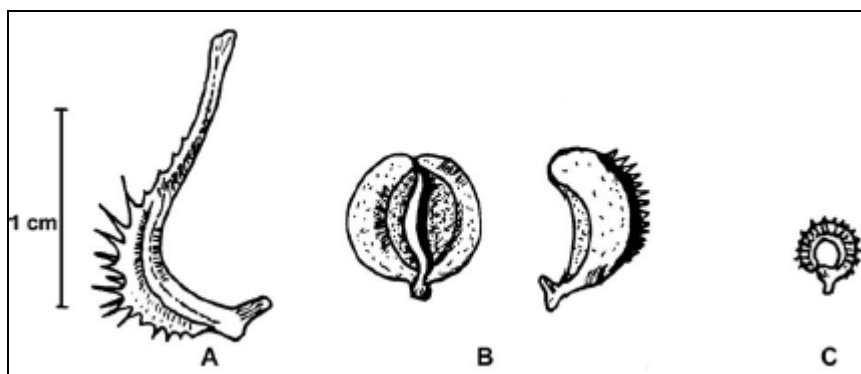


Figura 5- Morfologia dos aquénios de *Calendula arvensis* L.: A. rostrado, B. cimbiforme e C. anular (Adaptado de Ruiz de Clavijo 2005).



Figura 6- Infrutescência de *Calendula tripterocarpa* Rupr. e *Calendula officinalis* L.

A heterocarpia pode reflectir uma estratégia de adaptação a diferentes *habitats*, aumentando o desempenho (*fitness*) dos indivíduos que a possuem a sobreviver a ambientes espacialmente e temporalmente heterogêneos (Sorensen 1978, Gardocki *et al.* 2000). A polimorfia dos frutos pode resultar em diferenças na dispersão (tempo e agente), existem vários estudos que demonstram os efeitos da heterocarpia na dispersão em espécies da família Asteraceae, por exemplo em *Gymnarrhena micrantha* (Koller & Roth 1964) e em *Picris echinoides* (Sorensen 1978). No entanto, a heterocarpia também se pode reflectir na variação da predação, germinação e dormência. Podendo, assim, produzir efeitos na variação da distribuição espacial e temporal das espécies (Ruiz de Clavijo 2005).

De facto, em *Calendula* observa-se uma dupla estratégia de dispersão das sementes, resultante da produção de aquénios mais pequenos, vermiformes, com fraca capacidade de dispersão e de aquénios maiores e com adaptações a diferentes formas de dispersão, como por exemplo a presença de espinhos e ganchos para dispersão por epizoocoria ou de asas para dispersão por anemocoria (Heyn & Joel 1983, Gardocki *et al.* 2000, Ruiz de Clavijo 2005). Estas duas estratégias de dispersão, nos *taxa* anuais de *Calendula*, podem estar associadas a diferentes processos de polinização. Nos *taxa* anuais, as flores mais internas são autopolinizadas, produzindo aquénios anulares que permanecem no mesmo local onde a planta-mãe se desenvolveu, um ambiente favorável, deste modo, o genoma da planta-mãe será sempre perpetuado. Contrariamente, os aquénios desenvolvidos pelas flores mais periféricas, adaptados à dispersão, são provavelmente resultantes de polinização cruzada, sendo assim mais aptos para colonizar novos *habitats* (Heyn & Joel 1983).

A heterocarpia, para além de condicionar o tipo de dispersão, pode também influenciar a altura em que os aquénios são dispersos. Os aquénios cimbiformes e anulares dispersam primeiro do que os rostrados, que permanecem ligados ao receptáculo durante mais tempo (Ruiz de Clavijo 2005).

Adicionalmente, foram encontradas diferenças na taxa de germinação entre aquénios de diferentes tipos morfológicos (Gardocki *et al.* 2000, Ruiz de Clavijo 2005). Comprovando que cada tipo morfológico se encontra adaptado a diferentes condições ambientais (Gardocki *et al.* 2000).

Soliman (2003) efectuou diversas análises citológicas e moleculares em *C. arvensis* com o objectivo de observar o efeito da heterocarpia na diversidade genética desta espécie. E, de facto, verificou a existência de diferenças de tamanho e morfologia dos cromossomas entre plantas germinadas de diferentes tipos de aquénios.

Todas estas características facilitam o estabelecimento e expansão do género *Calendula*, explicando assim a sua ampla distribuição, aclarando os motivos pelos quais teve uma enorme expansão desde o seu centro primário de distribuição, no norte de África, até à sua actual distribuição (Heyn & Joel 1983). Contudo, os estudos até à data sobre heterocarpia em *Calendula* incidiram essencialmente nas espécies anuais, principalmente em *C. arvensis*. No entanto, dada a importância do tema, para um melhor conhecimento do género, seria interessante um estudo mais aprofundado da heterocarpia em *Calendula* que abrangesse também as espécies perenes, como por exemplo, o efeito da polinização na heterocarpia.

1.3.4. Relações intra-específicas em *Calendula* L.

Como já foi referido, a taxonomia deste género revela-se particularmente difícil (Norlindh 1977, Heyn & Joel, 1983). A grande variabilidade morfológica existente em *Calendula*, intra e inter-específica, conduz à existência de um largo espectro de formas e seus intermédios, reconhecidos por diversos nomes e incluídos em diferentes categorias taxonómicas (Heyn & Joel, 1983). Esta variabilidade acarreta dúvidas sobre os caracteres a utilizar na discriminação entre espécies. Por exemplo, apesar da heterocarpia ocorrer nos vários *taxa* de *Calendula*, os caracteres morfológicos dos

aquénios são usados com uma certa precaução. A sua morfologia é frequentemente variável e alguns tipos de aquénios são inconstantes, aparecendo esporadicamente, por vezes em espécies designadas como diferentes (Norlindh 1946). Já Lanza (1919), num dos estudos primordiais sobre este género, não utilizou como carácter discriminatório a morfologia dos aquénios. Na sua chave, os caracteres utilizados como discriminatórios entre *taxa* foram sobretudo a forma e pilosidade (pubescência) das folhas, a relação entre o comprimento das lígulas e das brácteas involucrais e o tamanho e cor dos capítulos (Norlindh 1943). Porém, Heyn *et al.* (1974) afirmam que se deve recorrer ao tamanho de partes vegetativas com alguma precaução, uma vez que verificaram, em plantas cultivadas experimentalmente, que o tamanho é extremamente influenciado mesmo por pequenas flutuações de condições externas como o solo, a humidade e a temperatura. Para além da elevada capacidade de hibridização entre diferentes *taxa* (Lanza 1919, Heyn & Joel 1983) que também dificulta a sua distinção.

Foram vários os autores que tentaram efectuar diferentes abordagens ao estudo do género *Calendula* (Norlindh 1946, 1977; Meusel & Ohle, 1966; Heyn *et al.*, 1974; Heyn & Joel 1983; Ohle, 1974, 1975a, b). Recentemente, foram efectuados dois estudos de classificação importantes, Heyn *et al.* (1974) em espécies anuais e Ohle (1974, 1975a, 1975b) em *taxa* perenes. Heyn *et al.* (1974) reconheceram no seu estudo 5 espécies anuais: *C. tripterocarpa* Rupr. com $2n = 30$, *C. arvensis* L. com $2n = 44$, *C. stellata* Cav. (incluindo *C. algeriensis* Boiss. & Reut.) com $2n = 14$, *C. palaestina* Boiss. e *C. pachysperma* Zoh, ambas com $2n = \pm 85$. As duas primeiras espécies são sinantrópicas e possuem uma distribuição vasta, as restantes têm uma distribuição mais restrita, *C. stellata* Cav. encontra-se na zona mais ocidental do Mediterrâneo (não ocorre na Península Ibérica), e as duas últimas espécies, altamente poliploides, na zona oriental. Da revisão sistemática de Ohle (1974, 1975a, 1975b) resultou a redução da categoria taxonómica de algumas espécies perenes antigas deste género a subespécies (Norlindh, 1977). Essencialmente, estes *taxa* foram divididos em três grupos de espécies: dois grupos do ocidente do Mediterrâneo, *C. suffruticosa* e *C. incana*, ambos com $2n = 32$ e várias subespécies, e o terceiro grupo, *C. marrocana* em que Ohle (1975a) inclui várias espécies (Heyn & Joel 1983).

1.3.5. Números cromossómicos nos *taxa* da Península Ibérica

De facto, o processo de especiação revela-se particularmente interessante dada a complexidade cariológica do género *Calendula*. Apesar da existência de numerosos trabalhos que reportam números cromossómicos para este género, a informação encontra-se dispersa, fragmentada e é frequentemente contraditória. Presume-se que más identificações ou erros de contagens estão na origem de muitos dos diferentes números cromossómicos reportados para as várias espécies de *Calendula* (Norlindh 1977).

Seguidamente, é apresentado um resumo da informação até à data obtida em relação aos números cromossómicos reportados para os *taxa* existentes na Península Ibérica. Relativamente às espécies perenes, neste estudo será seguida a nomenclatura proposta por Ohle (1974).

***Calendula arvensis* L., Sp. Pl. ed. 2, 1303 (1763)**

C. sancta L., *C. aegyptiaca* Pers., *C. bicolor* Raf., *C. parviflora* Raf., *C. crista-galli* Viv., *C. ceratosperma* Viv., *C. persica* C. A. Mey, *C. gracilis* DC., *C. micrantha* Tin. & Guss., *C. malacitana* Boiss. & Reut., *C. repanda* Boiss. & Noë, *C. micrantha* Boiss. & Noë, *C. palaestina* Boiss. var. *repanda* (Boiss. & Noë) Boiss., *C. arvensis* L. var. *parviflora* (Raf.) Batt., *C. arvensis* L. subsp. *macroptera* Rouy, *C. officinalis* L. var. *hydruntina* Fiori, *C. arvensis* L. subsp. *hydruntina* (Fiori) Lanza.

O número cromossómico mais comumente reportado para esta espécie é $2n = 44$ (19 artigos num total de 25). O primeiro registo deste número cromossómico foi realizado por Janaki-Ammal & Sobti (1962) em *C. arvensis* var. *persica* em espécimes indianos (Heyn *et al.* 1974), no entanto também foram registadas contagens de $2n = 44$ em Portugal (Fernandes & Queirós 1971a, Queirós 1973), Espanha (para a subespécie *C. arvensis* subsp. *macroptera*) (Gallego 1983), Itália (Meusel & Ohle 1966, Marchi *et al.* 1974, Scrugli 1974), Ilhas Canárias (Meusel & Ohle 1966, Van Loon 1974, Borgen 1975 e Baltisberger & Widmer 2006), Ilhas Baleares (Dahlgren *et al.* 1971), Palestina (Heyn *et al.* 1974, Diaz Lifante *et al.* 1992), Chipre (Vogt & Aparicio 1999), Marrocos (Oberprieler & Vogt 1993, Vogt & Oberprieler 2008), Egipto (Nordestam 1972),

Argélia (Aparicio 1989), Sérvia (Heyn & Joel 1983) e Kuwait (Malallah & Brown 1999). Powell *et al.* (1974) também reportaram este número cromossomático.

A contagem $2n = 36$ feita por Negodi (1936) foi considerada resultante de uma má identificação do espécime utilizado (Meusel & Ohle 1966, Fernandes & Queirós 1971a). Pawlowski & Jasiewicz (1971) e Malallah & Brown (1999) também reportaram o número cromossomático $2n = 36$ para esta espécie, porém, os últimos autores também registaram $2n = 44$ e $n = 22$. Supõem-se que a má identificação também esteja na origem da contagem $2n = 32$ de Janaki-Ammal & Sobti (1962) (Fernandes & Queirós 1971a). O valor de $2n = 42$ foi encontrado em espécimes de Andaluzia (Löve & Kjellqvist 1974), Ilhas Canárias (Borgen 1974) e Alemanha (Albers & Probsting 1998). Humphries *et al.* (1978) encontrou um valor cromossomático muito baixo, $2n = 18$ e $2n = 14$ (para *C. arvensis* var. *parvifolia*), em espécimes de Marrocos. Este valor é talvez resultante de uma possível confusão com os *taxa* existentes em Marrocos *C. marrocana* ($2n = 18$) e *C. stellata* ($2n = 14$). Também foi reportado o número cromossomático de $n=23$ por Rashid (1974).

C. arvensis é uma espécie extremamente polimórfica (Fernandes & Queirós 1971a, Baltisberger & Widmer 2006), que possui um largo espectro de formas conectadas por vários intermédios (Heyn *et al.* 1974). Borgen (1974) atribui a divergência do número cromossomático à hibridização, que é frequente entre espécies do género (Weddle 1941, Janaki-Ammal & Sobti 1962, Heyn & Joel 1983). No entanto, Baltisberger & Widmer (2006) consideram que as diferenças morfológicas encontradas entre plantas desta espécie não têm valor taxonómico. Heyn *et al.* (1974) consideram existir um complexo *C. arvensis* com $2n = 44$. Neste complexo estão incluídos vários *taxa* até à altura considerados como espécies distintas: forma “*arvensis*” (= *C. arvensis* L.); forma “*aegyptiaca*” (= *C. aegyptiaca* Pers.); forma “*persica*” (= *C. persica* C. A. Mey.), forma “*sancta*” (= *C. sancta* L.) e forma “*alata*”.

***Calendula incana* Willd.**

Calendula incana* Willd. subsp. *incana

C. tomentosa Desf., *C. marginata* Willd., *C. suffruticosa* Vahl. var. *tomentosa* Ball., *C. suffruticosa* Vahl. subsp. *tomentosa* (Desf.) Maire.

***Calendula incana* Willd. subsp. *algarbiensis* (Boiss.) Ohle, Feddes Repert. 85: 274 (1974)**

C. algarbiensis Boiss., *C. suffruticosa* Vahl. subsp. *algarbiensis* Sampaio.

***Calendula incana* Willd. subsp. *microphylla* (Lange) Ohle, Feddes Repert. 85: 274 (1974)**

C. microphylla Lange, *C. suffruticosa* Vahl. subsp. *microphylla* Sampaio.

***Calendula incana* Willd. subsp. *maderensis* (DC) Ohle, Feddes Repert. 85: 274 (1974)**

C. maderensis DC., *C. stellata* Lowe, non Cav., *C. amplexifolia* Reichenb.

Para a subespécie *C. incana* subsp. *incana* foi reportado o número cromossomático $2n = 32$ por Ohle (1974), Heyn & Joel (1983) e Ruiz de Clavijo (1989), contagens realizadas em espécimes de Espanha e por Vogt & Oberprieler (2008) em espécimes de Marrocos. Meusel & Ohle (1966), para esta espécie, indicam o número cromossomático $2n = 18$.

Para *C. incana* subsp. *maderensis*, endémica da Madeira, o número cromossomático reportado, $2n = 32$ (Meusel & Ohle 1966, Ohle 1974 e Press & Short 1994), é concordante com o determinado para a *C. incana* subsp. *incana*. Assim como para *C. incana* subsp. *algarbiensis* (Ohle 1974 e Strother & Watson 1997).

O número cromossomático $2n = 32$ é também reportado em quatro estudos para a subespécie *C. incana* subsp. *microphylla* (Mesquita Rodrigues 1953, Meusel & Ohle 1966, Fernandes & Queirós 1971a, Queirós 1973, Ohle 1974). Fernandes & Queirós (1971b) também reportaram outro número cromossomático ($2n = 20$).

***Calendula officinalis* L., Sp. Pl. 912 (1753)**

C. eriocarpa DC., *C. santamaria* hybr. Font-Quer.

C. officinalis é a única espécie cultivada deste género. A sua origem é desconhecida (Heyn *et al.* 1974). Desde a época medieval que esta espécie é cultivada (Nordenstam 1994). Para além de ser utilizada como planta ornamental em vários jardins por todo o mundo, *C. officinalis* também é utilizada na indústria farmacêutica devido à sua acção cicatrizante e anti-inflamatória (Silveira *et al.* 2002), na indústria cosmética em champôs, cremes e sabonetes e na indústria alimentar como corante natural (Vieira *et al.* 2006).

A contagem $2n = 28$ foi registada por Negodi (1936) em plantas de Itália e por Májovský *et al.* (1978) e Murin (1993) ambos em plantas provenientes da Eslováquia. Carr *et al.* (1999) reportaram o número cromossómico $2n = 14$. A contagem $2n = 32$ é, no entanto, a mais comum, 15 em 19 artigos que referem o número cromossómico desta espécie concordam com este valor. As contagens de $2n = 32$ foram feitas em plantas da Índia (Janaki-Ammal & Sobti 1962, Mehra *et al.* 1965, Gupta 1969, Gupta *et al.* 1972, Mehra & Remanandan 1976, Mathew & Mathew 1988, Gupta & Gill 1989), Inglaterra (Heyn & Joel 1983) e Polónia (Pogan *et al.* 1989, Pogan & Wcislo 1990). Weddle (1941), Meusel & Ohle 1966, Ohle 1974, Baltisberger & Huber 1987, Murin (1997) também reportaram este número cromossómico para *C. officinalis*.

***Calendula suffruticosa* Vahl., Symb. Bot. 2:94 (1791)**

Calendula suffruticosa Vahl. subsp. ***carbonellii*** Ohle, Feddes Repert. 85: 270 (1974)

Calendula suffruticosa Vahl. subsp. ***greuteri*** Ohle, Feddes Repert. 85: 270 (1974)

Calendula suffruticosa Vahl. subsp. ***lusitanica*** (Boiss.) Ohle, Feddes Repert. 85: 270 (1974)

C. lusitanica Boiss., *C. suffruticosa* Brotero, *C. fulgida* Raf. *forma minor* Lanza, *C. lusitanica* Boiss. var. *transtagana* Mariz

Para *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica*, endémica da Península Ibérica, apenas foi reportado o número cromossomático $2n = 32$ (Meusel & Ohle 1966, Fernandes & Queirós 1971a, Ohle 1974, Meikle 1976, Talavera 1979).

Até à data, apenas Ohle (1974) reportou o número cromossomático para *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii* e *C. suffruticosa* subsp. *greuteri*, $2n = 32$.

Calendula tripterocarpa Rupr., Bull. Phys.-Math, Acad. Petersb. 14: 231 (1856).

C. aegyptiaca auct.p.p. *C. platycarpa* Coss., *C. stellata* Cav. var. *hymenocarpa* Coss. & Kralik, *C. parviflora* Raf. var. *erostris* Lange, *C. aegyptiaca* “Desf.” subsp. *trippterocarpa* (Rupr.) Lanza

Parece não existirem dúvidas em relação ao número cromossomático desta espécie. O valor $2n = 30$ é reportado em espécimes de Israel (Heyn *et al.* 1974), Argélia ($n = 15$, Aparicio 1989, Diaz Linfante *et al.* 1992) e Marrocos (Oberprieler & Vogt 1993, Vogt & Oberprieler 2008). Nos dois últimos estudos foram encontrados cromossomas satélite. Heyn *et al.* (1974) propõem a inclusão em *C. tripterocarpa* da contagem cromossomática de $2n = 30$ realizada em espécimes de *C. aegyptiaca* do Iraque, Marrocos e do Sahara por Meusel & Ohle (1966), devido à presença de aquénios externos providos de 3 asas proeminentes, característica mais concordante com *C. tripterocarpa* do que com *C. aegyptiaca*. Até ao momento existe apenas um artigo que reporta um número cromossomático diferente para esta espécie, $2n = 54$ em espécimes das Ilhas Canárias (Dalgaard 1986).

Os números cromossomáticos disponíveis para os vários *taxa* têm servido como base de várias hipóteses sobre a evolução no género *Calendula* (Ehrendorfer 1970). Os números cromossomáticos básicos reportados para este género são **7** ($2n = 14$, *C. stellata*), **8** ($2n = 32$, maioria dos *taxa* perenes do norte de África e do sudoeste da Europa), **9** ($2n = 18$, alguns *taxa* perenes do norte de África), **11** ($2n = 44$, *C. arvensis*) e **10** ou **15** (Darlington & Wylie 1955, Nordindh 1977, Heyn & Joel 1983, Nordenstam 1994). A

dúvida entre os dois últimos números cromossômicos persiste devido a *C. tripterocarpa* ($2n = 30$). Alguns autores consideram este *taxon* diplóide ($x = 15$) (Norlindh 1977, Nordenstam 1994), enquanto que outros consideram triplóide ($x = 10$) (Heyn & Joel 1983).

Heyn *et al.* (1974) levantou hipóteses interessantes acerca do nível de ploidia: Estes autores reportaram pela primeira vez o número cromossômico de *C. palaestina* e *C. pachysperma* ($2n = \pm 85$) considerando-as auto-poliplóides de *C. arvensis* ($2n = 44$). Aceitam a hipótese de que *C. arvensis* seja tetraploide de um híbrido de duas espécies com $n = 15$ e $n = 7$. E afirmam também que a maioria dos *taxa* com baixo número cromossômico, quer anuais como perenes, ocorrem na parte sudoeste do Mediterrâneo, suportando a ideia defendida por Norlindh (1946) que o centro primário de evolução do género se situa nessa região.

Heyn & Joel (1983) propuseram um esquema explicativo para o processo de especiação dos indivíduos pertencentes a este género (Figura 7), baseando-se nos números cromossômicos e na elevada capacidade de hibridização de diferentes espécies pertencentes ao género *Calendula*.

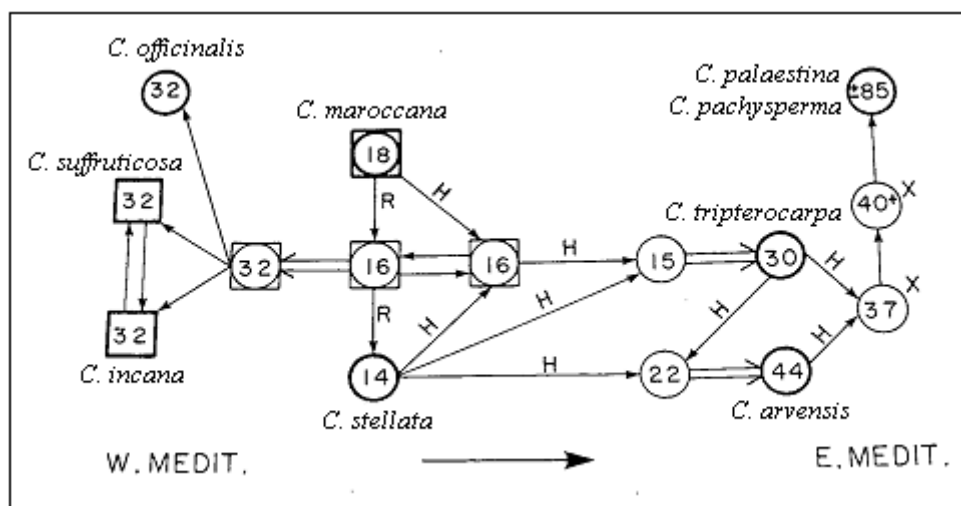


Figura 7- Esquema explicativo proposto por Heyn & Joel (1983) para o processo de especiação em *Calendula* L. baseado no padrão de hibridização e combinação e duplicação dos números cromossômicos. □- espécies perenes; ○-espécies anuais; X- novos indivíduos obtidos em cruzamentos experimentais; H- hibridização; R- redução; ⇒- duplicação cromossômica; os números correspondem ao número cromossômico diplóide ($2n$).

1.4. Número Cromossomático

O cariótipo é um elemento fundamental e extremamente relevante para a caracterização de uma espécie vegetal. A análise dos cromossomas permite o estudo da morfologia para o estabelecimento de cariótipos, permite ainda determinar o número cromossomático, níveis de ploidia, assim como detectar possíveis modificações cromossomáticas (deleções, duplicações). Apesar de actualmente já existirem técnicas mais sofisticadas em biosistemática (como a citometria de fluxo), a confirmação pela contagem do número de cromossomas continua a ser fundamental.

O número cromossomático é a componente do cariótipo mais discutida devido à grande diversidade que apresenta, frequentemente correlacionada com grupos taxonómicos e à sua constância geral dentro de populações e espécies. Nas Angiospérmicas e Pteridófitas existe uma ampla gama de números cromossomáticos que varia desde $2n=4$ nas células somáticas de *Haplopappus gracilis* (Nutt.) Gray a $2n=265$ em *Poa litorosa* Cheeseman ou $2n=500-520$ em *Ophioglossum vulgare* L. (Moore 1968).

Embora seja indiscutível a sua importância, apenas é conhecido o número cromossomático de 25 % de todas as espécies de Angiospermae (Bennet 1998). Adicionalmente, muitos números cromossomáticos reportados não são exactos (devido a erros de identificação ou de metodologia), nem precisos. São, por vezes, baseados em plantas de uma única população ou as contagens que não estão bem documentadas, faltando informação sobre o local de colheita ou o número do exemplar de herbário, tornando-se impossível a confirmação do valor reportado (Moore 1968, Baltisberger & Widmer 2006).

São três as condições que devem ser alcançadas para que um número cromossomático seja válido: os espécimes devem ser obtidos a partir de populações selvagens, exemplares devem ser guardados num herbário e a contagem deve ser baseada em vários espécimes de cada população. Sempre que possível, várias populações de regiões geográficas diferentes devem ser analisadas, principalmente indivíduos de zonas especialmente interessantes, como os limites da distribuição do *taxon* em estudo ou populações isoladas (por exemplo, ilhas) (Baltisberger & Widmer 2006).

Seguidamente será descrita uma das metodologias mais utilizadas na contagem do número cromossomático, a técnica de esmagamento (*squash*).

Na observação de cromossomas usam-se preferencialmente preparações temporárias às preparações definitivas feitas através da impregnação do material vegetal em parafina, essencialmente devido à rapidez e eficácia da sua execução. As preparações temporárias podem, no entanto, ser tornadas definitivas posteriormente, se tal for pretendido. As duas técnicas para a realização de preparações temporárias mais utilizadas na observação de cromossomas são a técnica do esfregaço (*smear*) e a técnica do esmagamento (*squash*), embora a última seja mais frequente. A técnica de esmagamento consiste na compressão do material vegetal, imerso numa gota de ácido acético (45%), entre a lâmina e a lamela com o polegar ou a ponta de uma agulha. O ácido acético é utilizado para aclarar o citoplasma, contrastando, assim, com a coloração dos cromossomas. A lâmina é também ligeiramente aquecida, este aquecimento aplanar as células e espalha os cromossomas. O grau de distribuição dos cromossomas ao longo da célula é influenciado pela pressão exercida na lamela, mas também pela quantidade de material vegetal e de ácido acético que é utilizado, em ambos os casos deve ser utilizada apenas a quantidade estritamente necessária, uma vez que o excesso dificulta a tarefa de aplanar as células (Darlington & La Cour 1976).

Apesar de existirem alguns princípios básicos na execução da técnica de esmagamento como o pré-tratamento (para cromossomas em mitose), a fixação, a hidrólise e a coloração, estes procedimentos são modificados dependendo da espécie em estudo, do objectivo da observação e muitas vezes também da preferência pessoal do investigador (Singh 2002). Este facto torna necessário a consulta de uma grande variedade de bibliografia, assim como o teste de diversos protocolos, por parte de um investigador principiante, nunca se esquecendo que muitos detalhes metodológicos importantes nunca foram, nem são publicados (Darlington & La Cour 1976).

Na observação de cromossomas em mitose é essencial a realização de um pré-tratamento utilizando um agente bloqueador da mitose. Este passo permite: i) inibir a formação do fuso acromático, aumentando, assim, o número de células em metáfase, prendendo os cromossomas na placa metafásica (Jahier & Tanguy 1992), ii) provocar uma maior contracção dos cromossomas, proporcionando melhor definição da sua

morfologia e iii) facilitar a penetração do fixador, aumentando a viscosidade do citoplasma (Singh 2002). No entanto, o agente antimitótico pode também ter um efeito aglutinador, agregando os cromossomas e, portanto, dificultando a sua observação de forma individualizada, por essa razão, é importante que para cada *taxon* se determine qual o melhor agente, assim como, quais os tempos a ser aplicados (Jahier & Tanguy 1992). Existem vários agentes bloqueadores como: água fria (0-2°C, entre 12 a 24 horas, um maior período de tratamento encurta significativamente o tamanho dos cromossomas); colquicina (0,1 a 0,5% durante 1 a 2 horas à temperatura ambiente; elevadas concentrações deste agente induzem poliploidia); 8-hidroxiquinolina (0,002M, 3 a 5 horas a 16 – 18°C, técnica desenvolvida por Tijo & Levan 1950), α -bromonaftaleno (água saturada, 2 a 4 horas à temperatura ambiente) e paradiclorobenzeno (2 horas a 15 – 20 °C, técnica desenvolvida por Palmer & Heer 1973) (Singh 2002).

O principal objectivo da fixação é coagular os constituintes da célula sem causar distorção, inchaço ou retracção dos cromossomas (Darlington & La Cour 1976, Singh 2002). Por esse motivo, o fixador deve penetrar rapidamente no tecido de forma a bloquear a evolução das divisões celulares, permitindo a conservação da integridade estrutural dos cromossomas (Jahier & Tanguy 1992). O agente fixador também serve de mordente, facilitando a acção do corante (Darlington & La Cour 1976). Os fixadores mais utilizados na observação de cromossomas são Carnoy I (etanol:ácido acético, na proporção 3:1, durante no mínimo 24 horas), Carnoy II (etanol:clorofórmio:ácido acético, 6:3:1) e ácido propiónico solução alcoólica (etanol:ácido propiónico:cloreto de ferro, 3:1:1, durante 24 horas) (Singh 2002). Após a fixação é possível armazenar o material vegetal em etanol 70% a 0-4°C durante um período prolongado (Darlington & La Cour 1976, Singh 2002).

Apesar de não ser uma etapa essencial, frequentemente o material em estudo é hidrolisado. A hidrólise tem como objectivo permitir um posterior bom esmagamento das células entre a lâmina e a lamela. O agente mais utilizado é o ácido clorídrico (HCl). Este ácido possui uma acção semelhante às acções enzimáticas, uma vez que conduz à dissolução das pectinas da lamela mediana e permite um aclarar do citoplasma, também liberta grupos aldeído das moléculas de açúcar do ADN por destruição das ligações

entre as bases púricas da desoxirribose, permitindo posteriormente a aplicação de corantes específicos que se ligarão a estes locais (Jahier & Tanguy 1992). Existem, no entanto, casos nos quais a hidrólise não é recomendada, de acordo com Singh (2002), a hidrólise com HCl não é recomendada quando se utiliza carmim alcoólico clorídrico, porque este ácido descolora o corante.

A coloração é uma etapa decisiva para uma boa observação que permita a contagem do número cromossómico, assim como estudar a morfologia e a estrutura dos cromossomas. Um bom agente corante tem aptidão para corar selectivamente os cromossomas, sendo capaz de diferenciar heterocromatina de eucromatina, ao mesmo tempo que deixa o citoplasma limpo. A técnica de coloração mais utilizada designa-se por técnica de Feulgen e usa como corante o reagente de Schiff. No entanto existem vários corantes que podem ser utilizados, como carmim acético, orceína acética, hematoxilina, orceína lacto-propiónica, Giemsa e carmim alcoólico clorídrico (Singh, 2002).

1.5. Análise do conteúdo em ADN nuclear

O conteúdo em ADN nuclear é uma característica biológica importante cuja aplicação se encontra distribuída por diversas áreas de investigação, como a biologia molecular, a ecologia e também a taxonomia e sistemática (Bennet *et al.* 2000). Vários estudos demonstraram a existência de relações entre o tamanho do genoma de uma espécie e a sua ecologia, distribuição, ciclo de vida, entre outros factores (Bennet 1998, Bennet & Leitch 2005b). O conhecimento do tamanho do genoma também pode fornecer informações bastante úteis na interpretação de relações filogenéticas e sistemáticas em diversos grupos taxonómicos (Doležal 1997, Ohri 1998, Garcia *et al.* 2004).

Apesar da sua inegável importância, o tamanho do genoma nuclear continua desconhecido para cerca de 98% das espécies de Angiospermae (Bennet & Leitch 2005c), percentagem na qual o género *Calendula* também se encontra inserido. Estes autores desenvolveram uma base de dados onde compilaram informação do conteúdo em ADN nuclear de cerca de 4427 espécies Angiospérmicas, disponível para consulta em: <http://www.kew.org/values/homepage.html> (Bennet & Leitch 2005a).

A citometria de fluxo (FCM) é considerada a metodologia ideal para a análise do conteúdo em ADN nuclear, devido à sua rapidez, precisão e conveniência. E, de facto, esta é a sua principal utilização em plantas. A FCM analisa propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (biológicas ou não biológicas) isoladas que fluem numa suspensão líquida (Loureiro & Santos 2004). Esta técnica permite medir simultaneamente múltiplos parâmetros em cada partícula individualmente e seleccionada aleatoriamente, a alta velocidade (entre 10^2 a 10^3 partículas por segundo) (Doležal 1997). Em relação aos métodos bioquímicos clássicos, a FCM é mais exacta, na medida em que estes métodos clássicos fornecem valores médios para números elevados de núcleos e não permitem a detecção de subpopulações. As metodologias mais recentes como a micro-espectrofotometria, a citofluorometria e a análise de imagens não conseguem competir em velocidade e conveniência com FCM. Esta técnica, comparando com o método clássico de contagem de cromossomas, é menos laboriosa e, portanto, mais conveniente, mais rápida, não necessita de células em divisão, é uma metodologia não destrutiva (Loureiro & Santos 2004). Porém, a

confirmação através do número cromossomático continua a ser essencial. Vários estudos de FCM previamente analisam o número cromossomático (Garcia *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2006, Loureiro *et al.* 2007a, Garcia *et al.* 2008). Por esse motivo, a contagem de cromossomas e a FCM podem ser vistas como duas metodologias complementares.

São inúmeros os grupos taxonómicos cujo conteúdo em ADN nuclear foi estimado através da FCM com vista à análise de relações filogenéticas de grupos taxonómicos (*Artemisia*, Garcia *et al.* 2004; *Festuca*, Loureiro *et al.* 2007a; *Dahlia*, Temsch *et al.* 2008).

A aplicação da FCM a células vegetais surgiu com Heller (1973), com a quantificação do conteúdo em ADN nuclear de *Vicia faba*, usando uma solução de núcleos isolados a partir de tecidos fixados tratados com pectinase e pepsina. Esta metodologia era bastante custosa e demorada, por esse motivo, o potencial desta nova disciplina só foi reconhecido dez anos mais tarde, quando Galbraith *et al.* (1983) desenvolveu um método eficaz de isolamento de núcleos celulares através da homogeneização mecânica do tecido vegetal numa solução tampão hipotónica com detergente não iónico (Loureiro *et al.* 2008). No entanto, a FCM foi originalmente desenvolvida bastante antes, no fim dos anos 50, para a investigação biomédica, fundamentalmente para a contagem e análise de células sanguíneas (Côrte-Real *et al.* 2002). Por esse motivo, a maioria dos métodos e protocolos existentes para FCM foram desenvolvidos para células animais. No entanto, a célula vegetal possui características únicas que tornam necessária a adaptação destes protocolos para os tecidos vegetais. As células vegetais possuem paredes celulares rígidas que complicam a obtenção de uma suspensão de organelos como núcleos, mitocôndrias, cloroplastos ou cromossomas isolados e em perfeitas condições. Assim como o vasto leque de metabolitos secundários produzidos ou a autofluorescência de alguns organelos como os cloroplastos podem também interferir, por exemplo, na detecção da fluorescência dos fluorocromos (Loureiro *et al.* 2008).

A determinação do conteúdo em ADN nuclear por citometria de fluxo é obtida através na intensidade de fluorescência relativa emitida por núcleos individualizados, corados com um fluorocromo específico. A metodologia descrita por Galbraith *et al.* (1983) é a mais utilizada para libertar os núcleos do tecido vegetal sem os danificar (Figura 8). O

tecido foliar (aproximadamente 50 mg) é cortado (*chopped*) com uma lâmina de barbear numa caixa de Petri contendo tampão de isolamento (Loureiro & Santos 2004).



Figura 8- Esquema do método descrito por Galbraith *et al.* (1983) para a obtenção de núcleos individualizados em suspensão para FCM (Loureiro & Santos 2004).

Existem vários tampões de isolamento de núcleos de células vegetais (Galbraith *et al.* 1983, Doležel *et al.* 1989, Arumuganathan & Earle 1991, Marie & Brown 1993, Otto 1990, Pfosser *et al.* 1995), que se diferenciam na composição. No entanto, normalmente apresentam iões de magnésio ou poliaminas para estabilizar a cromatina, Triton X-100 como detergente não iónico e por vezes também agentes redutores como mercaptoetanol ou PVP para inibir a acção de compostos fenólicos (Loureiro & Santos 2004). Como a eficiência do tampão de lise varia para cada espécie, uma boa escolha é fundamental. Um bom tampão de isolamento deve promover a libertação de núcleos livres de citoplasma e em quantidades suficientes, manter a integridade dos núcleos isolados, inibir a actividade das endonucleases (protecção contra a degradação do ADN) e facilitar a coloração do ADN (Doležel & Bartoš 2005). Recentemente, Loureiro *et al.* (2007b) desenvolveram dois tampões de isolamento, um geral (*General Purpose Buffer*,

GPB) e outro mais específico para tecidos recalcitrantes e, portanto, mais problemáticos (*Woody Plant Buffer*, WPB).

A melhor forma de avaliar a qualidade da suspensão de núcleos é através da análise dos histogramas de conteúdo relativo em ADN nuclear (Doležel & Bartoš 2005). Os histogramas deveriam conter picos G1 e G2 simétricos, com o mínimo ruído, no entanto, as distribuições obtidas apresentam sempre variações. Estas variações são expressas num coeficiente de variação (CV), obtido através da divisão do desvio padrão pela média e que varia entre 1 e 10% (Loureiro & Santos 2004). Análises com valores de CV entre 1 e 2% são consideradas de alta qualidade. O valor de 3% foi definido por Marie & Brown (1993) como um valor de rotina, enquanto Galbraith *et al.* (2002) estabeleceu um CV abaixo de 5% como critério de aceitação. Porém, estes valores, em plantas complexas como algumas lenhosas, são por vezes difíceis de se obter. Após o isolamento, a suspensão de núcleos é filtrada por uma rede de nylon com cerca de 50 µm, com o objectivo de eliminar resíduos (Loureiro & Santos 2004).

Segue-se a coloração dos núcleos com um fluorocromo específico para ADN. Os fluorocromos podem ser intercalantes ou específicos de determinados pares de bases, agrupando assim os corantes de acordo com a forma com que se ligam ao ADN. Os corantes intercalantes ligam-se quantitativamente na cadeia dupla de ADN, alguns exemplos são o iodeto de propídio (IP) e o brometo de etídio (BE). Inicialmente as análises eram efectuadas preferencialmente com BE, actualmente o IP é o fluorocromo intercalante mais utilizado em estimativas do conteúdo em ADN nuclear (Loureiro & Santos 2004). Porém, como ambos os corantes também têm afinidade para a cadeia dupla de ARN, torna-se essencial a adição de RNases para que estas destruam o ARN, evitando assim erros na estimação do conteúdo em ADN nuclear (Price & Johnston 1996). Os fluorocromos específicos de determinados pares de base (como DAPI que se liga preferencialmente a regiões ricas em A-T ou mitramicina a regiões ricas em G-C) apesar de proporcionarem, normalmente, valores de CV inferiores aos intercalantes, podem conduzir a análises erróneas quando os padrões de referência utilizados não possuem a mesma composição em pares de base que a amostra em estudo. Por esse motivo, os corantes intercalantes são usualmente preferidos aquando a selecção do fluorocromo a utilizar na análise do conteúdo em ADN (Loureiro & Santos 2004).

Em FCM, o conteúdo em ADN nuclear é estimado através da comparação com um padrão de referência. Os padrões de referência podem ser preparados externa ou internamente, ou seja, separadamente ou em conjunto com a amostra em estudo. No entanto, está provado que a utilização de padrões externos é susceptível a erros na estimativa do conteúdo em ADN da amostra, erros que podem ser provocados por variação do aparelho na altura da medição da fluorescência ou na variação da coloração. Mais uma vez, a escolha do padrão de referência é um passo importante na estimação do conteúdo em ADN nuclear da amostra em estudo (Loureiro & Santos 2004). Um padrão de referência ideal deve ter um conteúdo em ADN próximo da amostra, mas que não se sobreponha, deve também possuir um genoma estável, ser uma planta fácil de cultivar e que da qual se obtenham boas suspensões de núcleos livres de compostos secundários que possam interferir na coloração do ADN (Doležel & Bartoš 2005). Apesar de não existir um consenso na comunidade científica acerca dos padrões de referência a utilizar, Doležel *et al.* (1992) calibraram o tamanho do genoma de vários cultivares que são rotineiramente usados como padrão de referência, como por exemplo, *Pisum sativum* cv Ctirad ($2C=9,09$ pg).

Os pontos críticos da análise do conteúdo em ADN por FCM são a precisão e a reproductividade. De facto, podem existir variações técnicas (por exemplo, variações no aquecimento, no pH, na concentração de catiões bivalentes) ou biológicas (por exemplo, a presença de metabolitos secundários) que influenciem, por exemplo a fluorescência emitida ou detectada, conduzindo a diferenças artefactuais ou a diferenças reais que podem passar despercebidas. Por esse motivo, a comparação entre dados obtidos em laboratórios diferentes é complicada e deve ser sempre realizada com sentido crítico (Loureiro & Santos 2004).

CAPÍTULO 2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Este estudo inclui 11 *taxa* do género *Calendula* L. (*C. arvensis* subsp. *arvensis*, *C. arvensis* subsp. *macroptera*, *C. incana* subsp. *incana*, *C. incana* subsp. *algarbiensis*, *C. incana* subsp. *maderensis*, *C. incana* subsp. *microphylla*, *C. officinalis*, *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii*, *C. suffruticosa* subsp. *greuteri* e *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* e *C. tripterocarpa*) provenientes de 28 populações distribuídas ao longo da Península Ibérica e Arquipélago da Madeira (Figura 9). Na Tabela 1 encontram-se indicados os *taxa* estudados neste trabalho, assim como informação acerca do local de procedência, data de colheita, número e nome do colector. O material obtido de *C. incana* subsp. *maderensis* foi gentilmente cedido por Miguel Sequeira do Departamento de Biologia da Universidade da Madeira. Exemplares de todas as populações utilizadas neste estudo encontram-se guardados no herbário da Universidade de Aveiro (AVE). Neste estudo foi seguida a nomenclatura proposta por Ohle (1974, 1975a e b).

Todos os espécimes utilizados neste estudo foram colhidos no campo ou provêm de aquénios colhidos no campo que posteriormente foram colocados a germinar em placas de Petri, sobre papel de filtro embebido em água destilada ou em vasos contendo uma mistura de solo e perlite ou vermiculite (na proporção de 1:1). Todos os espécimes foram mantidos em condições homogéneas (temperatura: 20 ± 2 °C e intensidade luminosa: $60 \pm 5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

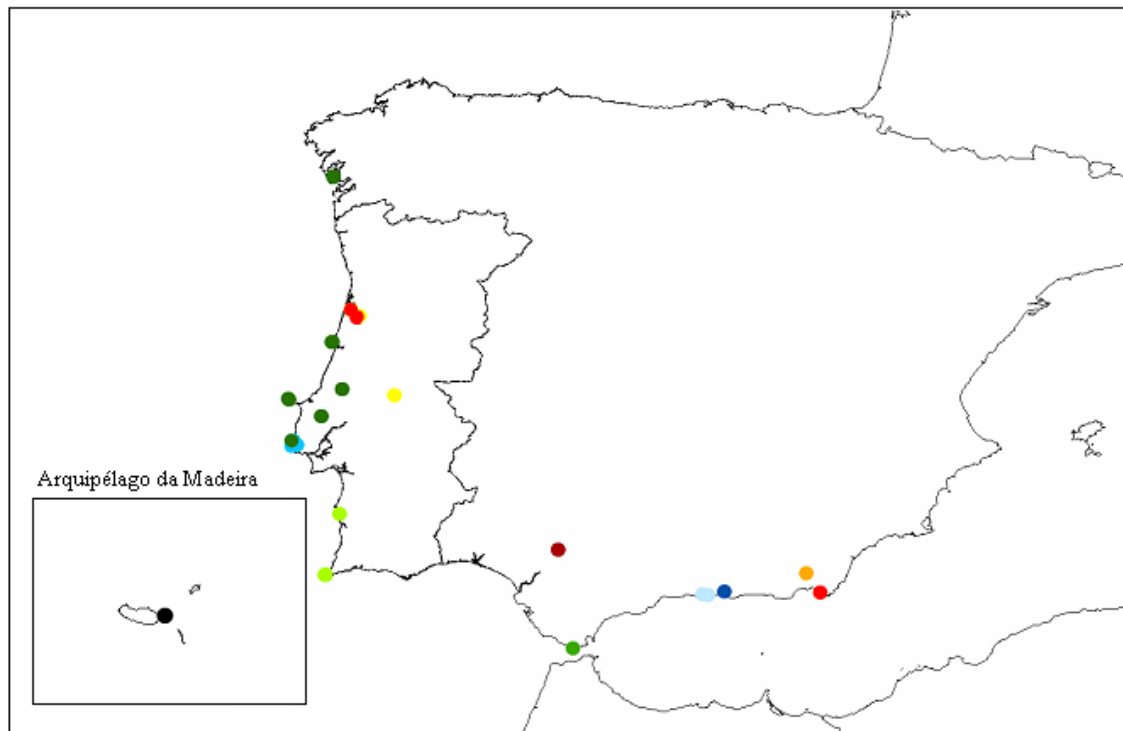


Figura 9- Localização das 28 populações estudadas na Península Ibérica e Arquipélago da Madeira. Os *taxa* estão diferenciados pela cor do seu símbolo: *C. arvensis* (vermelho), *C. arvensis* subsp. *macroptera* (vermelho escuro), *C. incana* subsp. *incana* (verde), *C. incana* subsp. *algarbiensis* (verde claro), *C. incana* subsp. *maderensis* (preto), *C. incana* subsp. *microphylla* (verde escuro), *C. officinalis* (amarelo), *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii* (azul claro), *C. suffruticosa* subsp. *greuteri* (azul escuro), *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* (azul) e *C. tripterocarpa* (laranja). Escala de 1:5000000.

2.2. Índice mitótico

A proliferação celular, mesmo em plantas ou sementes germinadas a crescer em condições controladas, está condicionada por ritmos internos e/ou ambientais, podendo assim variar grandemente ao longo do dia e entre *taxa*. Por essa razão, é frequente a determinação do índice mitótico em estudos citológicos. O índice mitótico, neste estudo, foi calculado como a percentagem total de núcleos que se encontram em mitose num determinado momento (Bolwell 1985). Utilizando um microscópio óptico, foram analisados entre 500 a 1000 núcleos, registando a fase do ciclo celular em que se encontravam durante 14 horas.

Tabela 1- Lista dos *taxa* pertencentes a *Calendula* L. estudados, com respectiva indicação da localização, data de colheita, nome do colector e número de herbário (AVE) das populações estudadas.

Taxa	
<i>C. arvensis</i>	Espanha: Andaluzia, Almeria, Pujaire, 2-IV-2007, <i>P Silveira & MJM Carqueja</i> 2979 . Portugal: Beira Litoral, Oliveira do Bairro, Águas Boas, 14-IV-2008, <i>P Silveira</i> 3020 . Portugal: Beira Litoral, Aveiro, 14-IV-2008, <i>P Silveira</i> 3021 .
<i>C. arvensis</i> subsp. <i>macroptera</i>	Espanha: Andaluzia, Sevilha, Alcalá de Guadaira, 5-IV-2007, <i>P Silveira & MJM Carqueja</i> 2985 .
<i>C. incana</i> subsp. <i>incana</i>	Espanha: Andaluzia, Cádiz, Tarifa, 5-VII-2005, <i>P Silveira</i> 2937b .
<i>C. incana</i> subsp. <i>algarbiensis</i>	Portugal: Baixo Alentejo, Sines, Porto Côvo, 2-VIII-2003, <i>P Silveira</i> 2898 . Portugal: Algarve, Vila do Bispo, Cabo de São Vicente, 4-VIII-2003, <i>P Silveira</i> 2902 . Portugal: Algarve, Vila do Bispo, Sagres, 18-X-2008, <i>S Nora & A Soukiazes in P Silveira</i> , 3033 .
<i>C. incana</i> subsp. <i>maderensis</i>	Portugal: Madeira; Ponta de S. Lourenço, Prainha, 5-XI-2008, <i>M. Sequeira</i> MS5676 (a-j).
<i>C. incana</i> subsp. <i>microphylla</i>	Portugal: Estremadura, Porto de Mós, Alvados, 8-IV-2006, <i>P. Silveira</i> 2939 . Portugal: Estremadura, Cadaval, Serra de Montejunto, 9-IV-2006, <i>P Silveira</i> 2940 . Espanha: Galiza, Pontevedra, Praia de Lanzada, 15-VIII-2006, <i>P Silveira & MJM Carqueja</i> 2976 . Portugal: Estremadura, Cadaval; Serra de Montejunto, 7-V-2008, <i>P Silveira</i> 3025 . Portugal: Estremadura, Peniche, Ilha Berlenga, 27-VIII-2007, <i>P Silveira</i> 3027 . Portugal: Beira Litoral, Figueira da Foz, Serra da Boa Viagem junto ao Farol, 4-X-2008, <i>P. Silveira & S. Nora</i> 3029 . Portugal: Estremadura, Sintra, Praia Grande, 21-IX-2004, <i>S Castro</i> 8A .

<i>C. officinalis</i>	Portugal: Beira Litoral, Aveiro, Oiã, 12-IV-2007, <i>P Silveira</i> 2986b . Portugal: Ribatejo, Abrantes, Alvega, 29-IV-2007, <i>P Silveira</i> 2986c . Portugal: Beira Litoral, Aveiro, 15-VII-2009, <i>S Nora in P Silveira</i> 3053 .
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>carbonelli</i>	Espanha: Andaluzia, Nerja, Maro, 6-VII-2005, <i>P Silveira</i> 2937c . Espanha: Andaluzia, Granada, Cerro Gordo, 3-IV-2007, <i>P Silveira & MJM Carqueja</i> 2983 . Espanha: Andaluzia, Granada, Cerro Gordo, 23-X-2008, <i>S Nora & A Soukiazes in P Silveira</i> 3036 .
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>greuteri</i>	Espanha: Andaluzia, entre Salobreña e Velez de Benadalla, no início do canhão do rio Guadalfeo, 22-VI-2009, <i>P Silveira</i> 3046 .
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>lusitanica</i>	Portugal: Estremadura, Sintra, 18-III-2008, <i>P Silveira</i> 3015 . Portugal: Estremadura, Sintra, São Pedro de Sintra, 18-III-2008, <i>P Silveira</i> 3016 . Portugal: Estremadura, Sintra, pe. Galamares, 18-III-2008 <i>P Silveira</i> 3017b . Portugal: Estremadura, Sintra, Fontanelas, 07-V-2008, <i>P Silveira</i> 3023 .
<i>C. tripterocarpa</i>	Espanha: Andaluzia, Almeria, Tabernas, 3-IV-2007, <i>P Silveira & MJM Carqueja</i> 2982 .

2.3. Determinação do número cromossomático

Para a determinação do número cromossomático, foi utilizada a metodologia descrita por Aparicio (1989), optimizada para o género em estudo.

Para a observação de cromossomas somáticos, raízes saudáveis e em crescimento foram pré-tratadas com água fria durante 12 horas, sendo este agente anti-mitótico aconselhado por Norlindh (1963) no estudo da tribo Calenduleae. Outros agentes bloqueadores de mitose foram utilizados mas os resultados obtidos não foram satisfatórios. Observou-se que 8-hidroxiquinoleína (0,002M), α -bromonaftaleno ou água fria durante 24 horas agregam e contraem demasiado os cromossomas, impedindo uma

boa contagem. De seguida, o material vegetal foi fixado em Carnoy I (etanol absoluto:ácido acético glacial, 3:1) durante 24 horas e armazenado no frio em etanol a 70%. Os meristemas foram corados com carmim alcoólico clorídrico (Snow, 1963) e as preparações temporárias foram preparadas segundo a técnica de esmagamento (*squash*). Outras técnicas de coloração e/ou agentes corantes foram testados como carmim acético, orceína acética (2%), reagente de Schiff (técnica de Feulgen) e hematoxilina, no entanto o uso de carmim alcoólico clorídrico resultou melhor na coloração dos cromossomas de *Calendula* sp. Díaz Lifante *et al.* (1992) também utiliza este corante para determinar o número cromossomático em *C. arvensis* e *C. tripterocarpa*.

As placas metafásicas foram fotografadas usando uma máquina digital Leica DC200 (Leica Microsystems Gmbtt, Wetzlar, Alemanha) incorporada num microscópio óptico Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments, Nova Iorque, EUA) e as imagens resultantes foram analisadas através do programa Leica IM 1000 v.1.1 (Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça).

Com o objectivo de estudar os cromossomas em meiose, foram colhidos botões florais que foram directamente fixados em Carnoy I durante 24 horas. O procedimento posteriormente seguido foi idêntico ao anteriormente descrito para o estudo de cromossomas em mitose.

Para verificar a existência de contagens cromossomáticas anteriores foram pesquisados índices de números cromossomáticos de plantas (Darlington & Wylie 1955, Federov 1969, Goldblatt & Johnson 1979, Martín Ciudad 1991, Pastor Díaz 1997), publicações anteriores (foram analisados 54 artigos, maioritariamente contagens regionais de números cromossomáticos), assim como bases de dados de números cromossomáticos (como por exemplo *Index to Plant Chromosome Numbers*, <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>).

2.4. Determinação do conteúdo em ADN nuclear

O conteúdo em ADN nuclear foi estimado através de citometria de fluxo segundo a metodologia descrita em Loureiro *et al.* (2007a). Este estudo foi desenvolvido no

Laboratório de Biotecnologia e Citómica (<http://labbiocyt.web.ua.pt>) do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Tecido foliar de *Calendula* sp. e de *P. sativum* (50 mg de cada) foi fragmentado com a ajuda de uma lâmina de barbear (*chopping*) numa caixa de Petri contendo 0,5 mL de tampão de lise WPB (0.2 M Tris.HCl, 4 mM MgCl₂.6H₂O, 2 mM EDTA Na₂.2H₂O, 86 mM NaCl, 10 mM metabisulfito de sódio, 1 % PVP-10, 1 %(v/v) Triton X-100, pH 7.5; Loureiro *et al.* 2007b), esta técnica para isolar núcleos foi descrita por Galbraith *et al.* (1983). A solução obtida foi filtrada através de uma rede de nylon de 50 µm e foi adicionado 50 µg.mL⁻¹ de iodeto de propídio (PI, Fluka, Buchs, Suíça) para corar o ADN e como este corante também cora ARN, também foram adicionados 50 µg.mL⁻¹ de RNase (Fluka, Buchs, Suíça). As amostras foram analisadas num citómetro de fluxo Beckman Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, Hialeah, FL, EUA) equipado com um laser de árgon arrefecido com ar, com 25mW a operar a 488 nm. Para todas as amostras de *Calendula* sp., *Pisum sativum* L. cv Ctirad (2C = 9.09 pg de ADN, Doležel *et al.* 1998) foi utilizada como padrão de referência interno. Em cada amostra foram analisados no mínimo 5000 núcleos. Em 16 (populações 3020 e 3021 de *C. arvensis*; 2898, 2902, 2903 e 3033 de *C. incana* subsp. *algarbiensis*; 2939, 2940, 2976, 3027 e 8A de *C. incana* subsp. *microphylla*; 2986b de *C. officinalis*; 2937c e 3036 de *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii*, 3046 de *C. suffruticosa* subsp. *greuteri* e 3016 e 3017 de *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica*) das 28 populações analisadas não foi possível obter o número mínimo de 3 indivíduos amostrados. Nestes casos, as populações nunca foram analisadas individualmente, mas sim em conjunto com outras populações no mesmo *taxon*.

O conteúdo em ADN nuclear (2C; segundo Greilhuber *et al.* 2005) para cada *taxa* de *Calendula* foi estimado de acordo com a seguinte fórmula:

Conteúdo em ADN nuclear (2C) em pg $= \frac{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ de } Calendula \text{ sp.}}{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ de padrão interno}} \times \text{Conteúdo em ADN nuclear do padrão interno}$	
---	--

2.5. Análise estatística

Para analisar a variação do conteúdo em ADN nuclear entre os diferentes *taxa* foi efectuado o teste *t* ou a análise de variância simples (*one-way* ANOVA). Quando necessário, foi aplicado o teste *post hoc* de comparação múltipla Tukey para determinar exactamente quais os grupos que apresentam valores significativamente diferentes. A análise estatística foi realizada usando o programa StatistiXL v.1.7 (Broadway-Nedlands, Australia).

CAPÍTULO 3. Resultados

3.1. Índice mitótico

O índice mitótico foi monitorizado durante 14 horas (Tabela 2). A actividade mitótica variou entre 2,50% ($\pm 0,31$) e 6,28% ($\pm 1,07$). Foi registado um pico de actividade às 8h da manhã. No entanto, estatisticamente, apenas os valores obtidos às 6h, 18h e 20h, são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) dos obtidos no pico de actividade mitótica.

Esta determinação tinha como principal objectivo detectar a melhor hora do dia para realizar a colheita de raízes para a contagem do número cromossómico. Averiguou-se que a melhor altura para a colheita de raízes em divisão de celular é às 8 horas.

Tabela 2- Variação da actividade mitótica (%) em *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica*. Os valores marcados (*) apresentam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em relação à hora com maior actividade celular.

Horas	Índice mitótico (%)
6	2,67 \pm 0,44*
8	6,28 \pm 1,07
10	3,57 \pm 0,13
12	4,34 \pm 0,32
14	4,46 \pm 1,01
16	4,47 \pm 2,00
18	3,18 \pm 0,41*
20	2,50 \pm 0,31*

3.2. Número cromossomático

Seguidamente, são apresentados os números cromossomáticos determinados neste estudo para os *taxa* (Tabela 3) do género *Calendula* existentes na Península Ibérica, assim como os números cromossomáticos reportados até à data com respectiva referência.

Tabela 3- Números cromossomáticos em *Calendula*: número cromossomático observado neste estudo e valores reportados com respectivas referências.

Taxa	Número Cromossomático				Referências
	Observado n	2n	Reportado n	2n	
<i>C. arvensis</i>	-	44	22 ¹	14 ² , 18 ³ , 36 ⁴ , 42 ⁵ , 44 ⁶ , 46 ⁷	¹ Heyn & Joel 1983, Aparicio 1989. ^{2,3} Humphries <i>et al.</i> 1978. ⁴ Negodi 1936, Janaki-Ammal & Sobti 1962, Pawlowski & Jasiewicz (1971), Malallah & Brown 1999. ⁵ Borgen 1974, Löve & Kjellqvist 1974, Albers & Probsting 1998. ⁶ Meusel & Ohle 1966, Dahlgren <i>et al.</i> 1971, Fernandes & Queirós 1971a, Nordestam 1972, Queirós 1973, Heyn <i>et al.</i> 1974, Marchi <i>et al.</i> 1974, Powell <i>et al.</i> 1974, Scrugli 1974, Van Loon 1974, Borgen 1975, Diaz Lifante <i>et al.</i> 1992, Oberprieler & Vogt 1993, , Malallah & Brown 1999, Vogt & Aparício 1999, Baltisberger & Widmer 2006, Vogt & Oberprieler 2008. ⁷ Rashid (1974).
<i>C. arvensis</i> subsp. <i>macroptera</i>	-	-	-	44	Gallego 1983
<i>C. incana</i> subsp. <i>incana</i>	-	-	16 ¹	18 ² , 32 ³	¹ Heyn & Joel 1983, Ruiz de Clavijo 1989. ² Meusel & Ohle 1966. ³ Ohle 1974, Vogt & Oberprieler 2008.
<i>C. incana</i> subsp. <i>algarbiensis</i>	-	-	-	32	Ohle 1974, Strother & Watson 1997
<i>C. incana</i> subsp. <i>maderensis</i>	-	-	-	32	Meusel & Ohle 1966, Ohle 1974, Press & Short 1994
<i>C. incana</i> subsp. <i>microphylla</i>	-	32	-	20 ¹ , 32 ²	¹ Fernandes & Queirós 1971b. ² Mesquita Rodrigues 1953, Meusel & Ohle 1966, Fernandes & Queirós 1971a, Queirós 1973, Ohle 1974.

<i>C. officinalis</i>	-	32	16 ¹	14 ² , 28 ³ , 32 ⁴	¹ Mehra <i>et al.</i> 1965, Gupta 1969, Gupta <i>et al.</i> 1972, Mehra & Remanandan 1976, Heyn & Joel 1983, Mathew & Mathew 1988. ² Carr <i>et al.</i> 1999. ³ Negodi 1936, Májovský <i>et al.</i> 1978, Murin 1993. ⁴ Weddle 1941, Janaki-Ammal & Sobti 1962, Meusel & Ohle 1966, Ohle 1974, Baltisberger & Huber 1987, Gupta & Gill 1989, Pogan <i>et al.</i> 1989, Pogan & Wcislo 1990, Murin 1997.
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>carbonellii</i>	-	-	-	32	Ohle (1974).
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>greuteri</i>	-	-	-	32	Ohle (1974).
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>lusitanica</i>	16	32	16 ¹	32 ²	¹ Talavera 1979. ² Meusel & Ohle 1966, Fernandes & Queirós 1971a, Ohle 1974, Meikle 1976.
<i>C. tripterocarpa</i>	-	30	15 ¹	30 ² , 30+2B ³ , 54 ⁴	¹ Aparicio 1989. ² Meusel & Ohle 1966, Heyn <i>et al.</i> 1974, Diaz Linfante <i>et al.</i> 1992. ³ Oberprieler & Vogt 1993, Vogt & Oberprieler 2008. ⁴ Dalgaard 1986.

Os números cromossómicos observados são concordantes com os valores mais citados na bibliografia. Foi encontrado em *C. arvensis* o valor de $2n = 44$ (Figura 10A), em *C. incana* subsp. *microphylla* $2n = 32$ (10B), em *C. officinalis* $2n = 32$ (Figura 10C), em *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* $2n = 32$, número que foi apoiado pelo valor $n = 16$ encontrado em botões florais da mesma espécie (Figura 10D e 10F) e em *C. tripterocarpa* $2n = 30$ (10E). Nas espécies estudadas não foram encontrados cromossomas satélite.

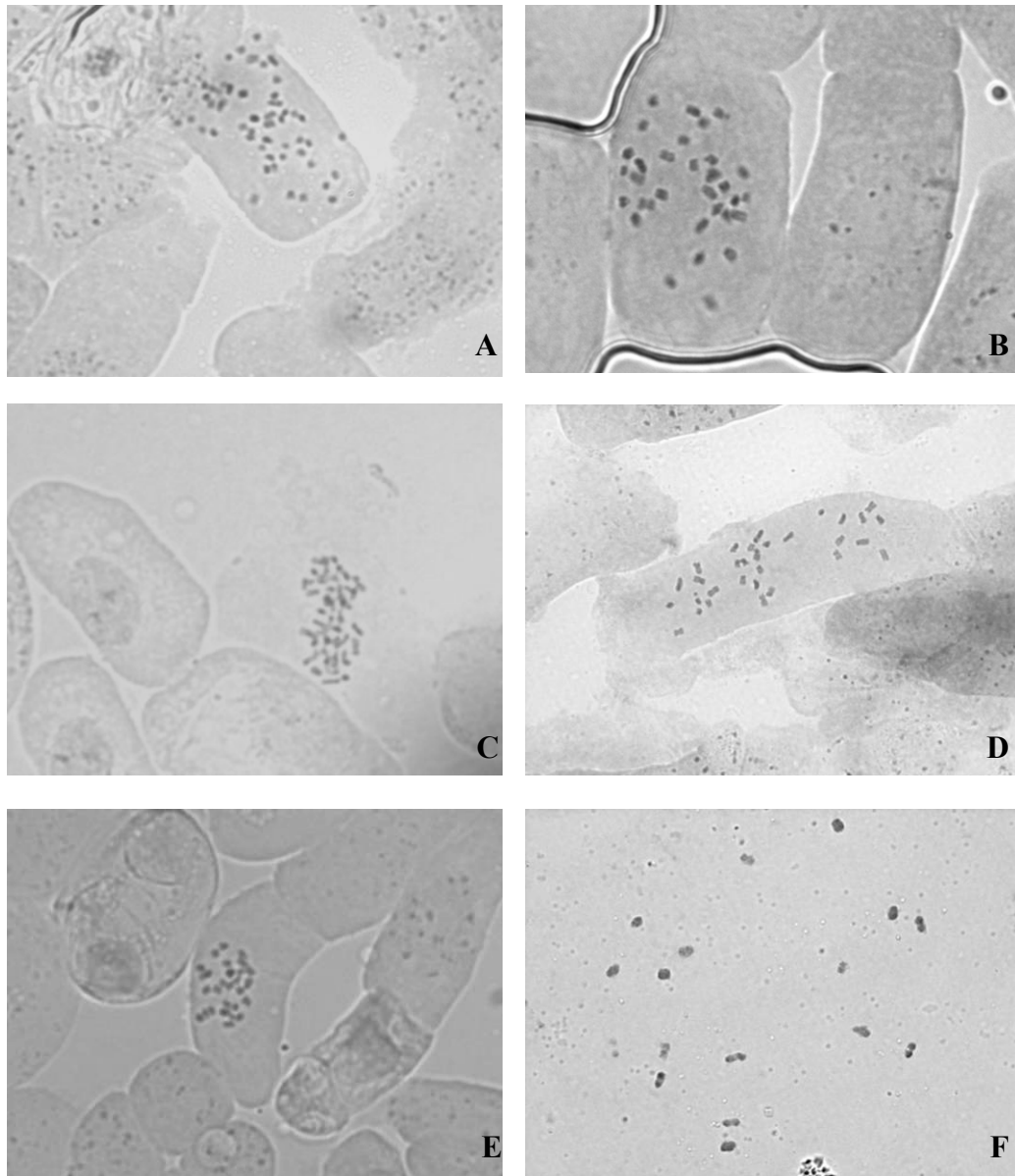


Figura 10- Números cromossómicos em *Calendula* spp. A-C. Placas metafásicas com cromossomas corados com carmim clorídrico alcoólico, *Calendula arvensis*, $2n = 44$ (A), *Calendula officinalis*, $2n = 32$ (B), *Calendula incana* subsp. *microphylla*, $2n = 32$ (C), *Calendula suffruticosa* subsp. *lusitanica*, $2n = 32$ (D) e *Calendula tripterocarpa*, $2n = 30$ (E). F. Célula de *Calendula suffruticosa* subsp. *lusitanica* em diacinese ($n = 16$).

3.3. Conteúdo em ADN nuclear

O conteúdo em ADN nuclear de *taxa* pertencentes ao género *Calendula* foi determinado pela primeira vez através de FCM (Tabela 4). Os histogramas resultantes (Figura 11) mostram picos G₀/G₁ de boa qualidade (média global de CV = 3,70%). Com este estudo o conteúdo em ADN nuclear torna-se conhecido para todos os *taxa* do género *Calendula* existentes na Península Ibérica. O conteúdo em ADN nuclear (tamanho do genoma holoploide, 2C) nos *taxa* de *Calendula* estudados varia entre 5,66 pg/2C em *C. arvensis* e 2,96 pg/2C em *C. officinalis*.

Tabela 4- Conteúdo em ADN nuclear em *Calendula* spp.

Taxa	Conteúdo em ADN nuclear							
	Nº de		2C (pg)	Variação 2C (pg)		2C (Mbp)	CV (%)	n
	2n	pop.		Min.	Max.			
<i>C. arvensis</i> L.	44	4	5,66 ± 0,48 ^a	5,20	6,59	5535,480	3,55	14
<i>C. officinalis</i> L.	32	3	2,96 ± 0,08 ^b	2,89	3,15	2891,251	3,86	9
<i>C. tripterocarpa</i> Rupr.	30	1	3,54 ± 0,06 ^c	3,48	3,62	3465,363	3,32	5
<i>C. incana</i> Willd.	32	13	3,26 ± 0,11 ^c	2,99	3,41	3185,962	3,87	29
<i>C. suffruticosa</i> Vahl	32	8	3,42 ± 0,09 ^c	3,26	3,63	3343,803	3,52	24

Na tabela encontra-se indicado o número cromossomático (2n) reportado e o número de populações estudadas para cada *taxon*, assim como o valor médio do conteúdo em ADN nuclear estimado, em pg, com respectivo desvio padrão, e em Mbp; o valor máximo e mínimo de conteúdo em ADN nuclear (em pg); o coeficiente de variação médio do pico G₀/G₁ (CV) em percentagem e o número de indivíduos analisados (n) para cada *taxa*. Os valores de conteúdo em ADN nuclear 2C em Mbp foram obtidos através da proporção: 1 pg ADN = 978 Mbp (Doležel *et al.* 2003). As médias seguidas da mesma letra (a, b c ou d) não são significativamente diferentes entre si (P≤0,05), de acordo com o teste de comparação múltipla Tukey.

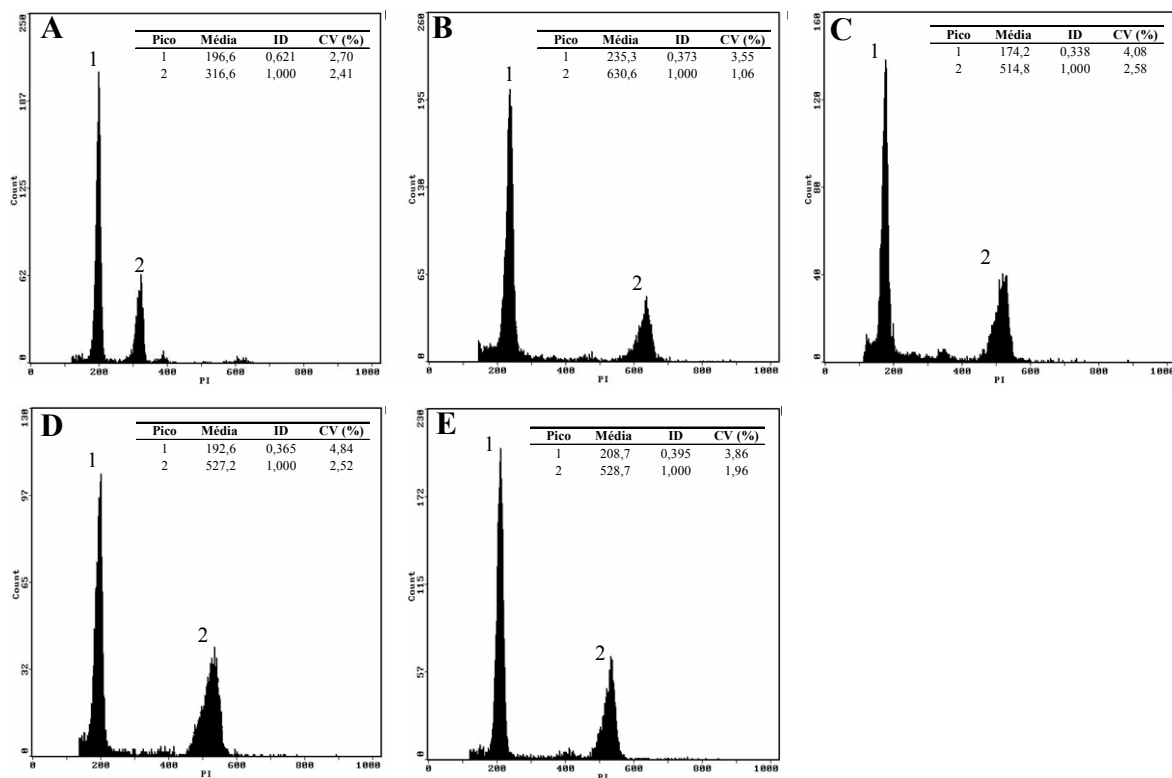


Figura 11- Histogramas de fluorescência obtidos através da análise simultânea de núcleos isolados de *Calendula* spp. e de *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C= 9,09 pg de ADN, padrão de referência interno): A. *C. arvensis* (2n = 44), B. *C. incana* subsp. *microphylla* (2n = 32), C. *C. officinalis* (2n = 32), D. *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* (2n = 32) e E. *C. tripterocarpa* (2n = 30). Em todos os histogramas estão marcados dois picos: 1. núcleos de *Calendula* spp. na fase G₀/G₁ e 2. núcleos de *P. sativum* cv. Ctirad (padrão interno) na fase G₀/G₁; para cada um dos picos é dado o valor do canal médio (Média), o índice de ADN (ID, rácio entre o valor do canal médio da amostra e da planta padrão) e o coeficiente de variação em percentagem (CV).

O esquema explicativo do processo de especiação no género *Calendula* proposto por Heyn & Joel (1983) foi adaptado a este estudo (Figura 12). Juntamente com a informação dada pelo esquema foi acrescentado aos *taxa* analisados neste estudo o valor do seu conteúdo em ADN nuclear. Verifica-se que os *taxa* estudados se encontram em lados extremos do esquema. Também se pode observar que os *taxa* da região oriental do Mediterrâneo possuem valores superiores de conteúdo em ADN nuclear comparativamente com os *taxa* da região ocidental.

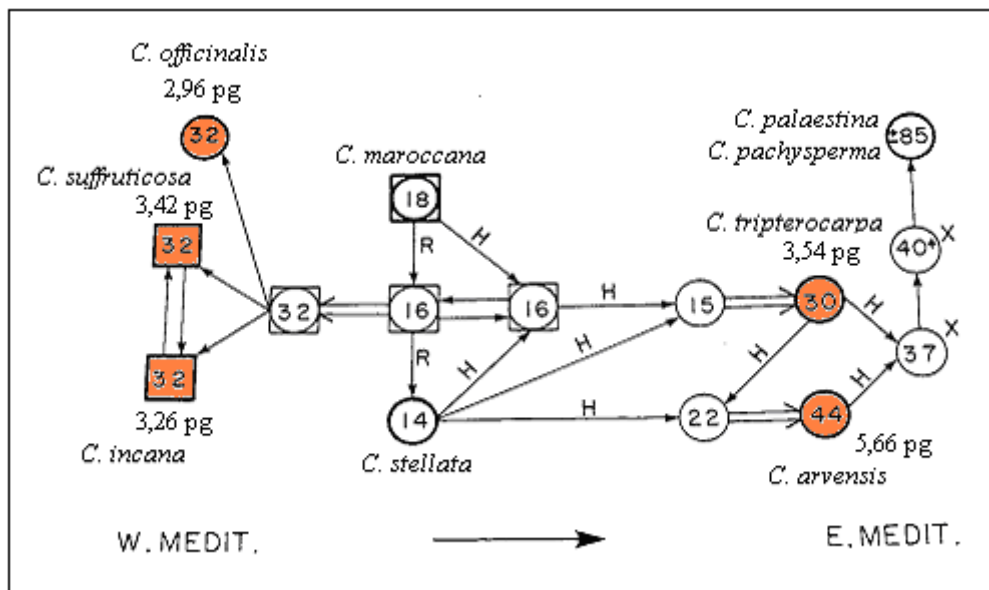


Figura 12- Esquema explicativo do processo de especiação em *Calendula* L. Os *taxa* contemplados neste estudo estão a laranja, os números correspondem ao número cromossómico diplóide (2n), ao lado do nome de cada *taxa* encontra-se o valor do seu conteúdo em ADN nuclear (2C em pg). Esquema adaptado de Heyn & Joel (1983).

A variação intra-específica, na maioria dos *taxa*, apresenta valores muito baixos (entre 1,81 e 3,36 %), indicando uma elevada homogenidade entre as populações de cada *taxon*. *C. arvensis* é a excepção, o coeficiente de variação de 8,49% indica que as populações estudadas deste *taxon* são bastante distintas entre si. Após análise estatística (Tabela 5), verifica-se que o valor de 2C encontrado em indivíduos provenientes de Espanha, Pujare (*P Silveira* 2979, $6,53 \pm 0,06$ pg) é significativamente superior ($P < 0,001$) ao encontrado em indivíduos provenientes de Portugal, Oiã (*P Silveira* 3020),

com $5,39 \pm 0,09$ pg e de Espanha, Alcalá de Guadaire perto de Sevilha (*C. arvensis* subsp. *macroptera*, P Silveira 2985), com $5,50 \pm 0,18$ pg.

Tabela 5- Conteúdo em ADN nuclear em populações de *Calendula arvensis*.

População de <i>C. arvensis</i>	Conteúdo em ADN nuclear	
	2C (pg)	n
Espanha, Pujaire (P Silveira 2979)	$6,53 \pm 0,06^*$	3
Portugal, Oiã (P Silveira 3020)	$5,39 \pm 0,09$	7
Espanha, Alcalá de Guadaire (P Silveira 2985)	$5,50 \pm 0,17$	3

O valor marcado com o símbolo (*) apresenta diferenças altamente significativas ($P < 0,001$) em relação aos restantes valores

Na Tabela 6 pode-se observar o valor médio do tamanho do genoma holoploide (2C), assim como o tamanho do genoma monoploide (Cx) estimado para todos os *taxa* de *Calendula* existentes na Península Ibérica, com a exceção de *C. tripterocarpa*. Este *taxon* não foi incluído, propositadamente, devido à incerteza no nível de ploidia. Como foi referido anteriormente, persistem dúvidas se *C. tripterocarpa* possui um nível de ploidia 2x (diplóide) ou 3x (triplóide).

Tabela 6- Tamanho do genoma holoploide (2C) e monoploide (Cx) em *Calendula* ssp.

Taxa	2n	Nº de populações	Conteúdo em ADN nuclear		Nível de ploidia
			2C (pg)	Cx (pg)	
<i>C. arvensis</i>	44	4	$5,66 \pm 0,48$	1,461	4
<i>C. incana</i>	32	13	$3,26 \pm 0,11$	1,629	2
<i>C. officinalis</i>	32	3	$2,96 \pm 0,08$	1,478	2
<i>C. suffruticosa</i>	32	8	$3,42 \pm 0,09$	1,71	2

Na tabela encontra-se indicado o número cromossómico (2n) reportado e o número de populações estudadas para cada *taxon*, assim como o valor médio do tamanho do genoma holoploide (2C) estimado, com o respectivo desvio padrão, o valor médio do tamanho do genoma monoploide (Cx) e o nível de ploidia de cada *taxa*.

Analisando o tamanho do genoma monoploide (Cx) em *Calendula* (Tabela 6), verifica-se uma maior proximidade entre *C. arvensis* (1,46 pg/Cx) e *C. officinalis* (1,48 pg/Cx), ambas espécies anuais, e também entre *C. incana* (1,63 pg/Cx) e *C. suffruticosa* (1,71

pg/Cx). É importante notar que a espécie com maior nível de ploidia é também a que apresenta um menor valor de Cx (*C. arvensis*).

Foram também obtidos resultados interessantes através da análise do conteúdo em ADN nuclear dos *taxa* com o número cromossomático $2n = 32$ (Figura 13). Dentro deste grupo com o mesmo número cromossomático é possível verificar que *C. officinalis* (2,97 pg/2C), possui um conteúdo em ADN nuclear significativamente inferior ($P < 0,001$) do que os restantes *taxa* (média de 3,33 pg/2C).

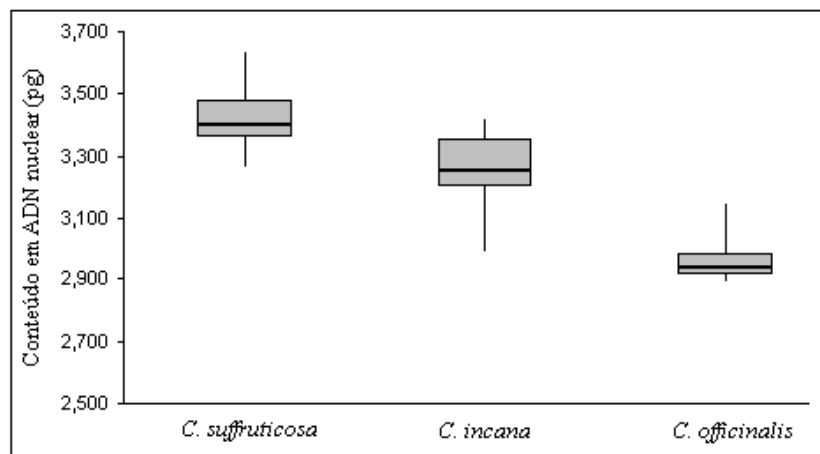


Figura 13- Representação gráfica do conteúdo em ADN nuclear das espécies com o número cromossomático $2n = 32$: *C. suffruticosa*, *C. incana* e *C. officinalis*. Os valores encontram-se distribuídos por 4 áreas de igual frequência (quartis), o conjunto de valores compreendidos entre o 1º e o 3º quartis encontram-se representados por um rectângulo (caixa) com a mediana indicada por uma linha horizontal, as duas linhas adjacentes indicam os extremos inferior e superior dos valores.

Relativamente aos *taxa* anuais, estes apresentam conteúdo em ADN nuclear perfeitamente diferenciável entre si. As três espécies possuem números cromossomáticos diferentes e também, como é possível observar na Figura 14, os valores de 2C obtidos para cada espécie não se sobrepõem. *C. arvensis* é a espécie que apresenta um conteúdo em ADN nuclear maior, 5,66 pg/2C (variando entre 5,20 e 6,59 pg/2C), seguida de *C. tripterocarpa* com 3,54 pg/2C (entre 3,48 e 3,62 pg/2C) e *C.*

officinalis com 2,96 pg/2C (entre 2,89 e 3,15 pg/2C). Após análise estatística verifica-se que *C. arvensis* e *C. officinalis* apresentam um conteúdo em ADN nuclear significativamente diferentes de todos os restantes taxa em estudo, incluindo os taxa perenes também ($P < 0,001$).

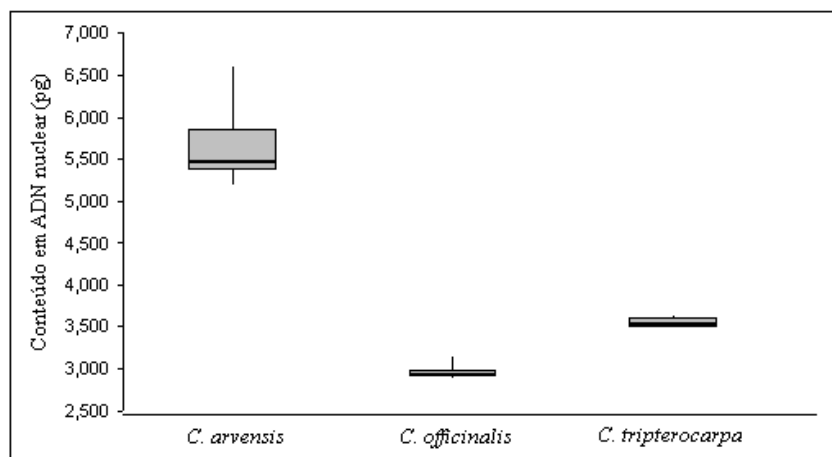


Figura 14- Representação gráfica do conteúdo em ADN nuclear dos taxa anuais de *Calendula* L.. Os valores encontram-se distribuídos por 4 áreas de igual frequência (quartis), o conjunto de valores compreendidos entre o 1º e o 3º quartis encontram-se representados por um rectângulo (caixa) com a mediana indicada por uma linha horizontal, as duas linhas adjacentes indicam os extremos inferior e superior dos valores.

Analisando a Tabela 4, verifica-se que *C. incana* e *C. suffruticosa* apresentam um conteúdo em ADN nuclear semelhante, tendo *C. suffruticosa* um conteúdo em ADN nuclear ligeiramente superior ($3,42 \pm 0,09$ pg/2C), embora não significativo, que *C. incana* ($3,26 \pm 0,11$ pg/2C). No entanto, através de uma análise mais pormenorizada (Tabela 7, Figura 15) é possível verificar que *C. incana* subsp. *microphylla* (com 3,33 pg/2C) e *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* (3,38 pg/2C) apresentam conteúdos em ADN nuclear, em grande medida, intermédios entre os dois grupos.

Tabela 7- Conteúdo em ADN nuclear de *Calendula incana* e *Calendula suffruticosa*.

Taxa	Nº de populações	Conteúdo de ADN nuclear			
		2C (pg)	Variação 2C		n
			Min.	Max.	
<i>C. incana</i> subsp. <i>incana</i>	1	3,26 ± 0,08 ^{ab}	3,17	3,38	5
<i>C. incana</i> subsp. <i>algarbiensis</i>	4	3,16 ± 0,15 ^a	2,99	3,35	6
<i>C. incana</i> subsp. <i>maderensis</i>	1	3,21 ± 0,02 ^{ab}	3,19	3,25	5
<i>C. incana</i> subsp. <i>microphylla</i>	7	3,33 ± 0,08 ^{bc}	3,17	3,41	13
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>carbonellii</i>	3	3,47 ± 0,09 ^{de}	3,33	3,55	6
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>greuteri</i>	1	3,58 ± 0,07 ^d	3,53	3,63	2
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>lusitanica</i>	4	3,38 ± 0,04 ^{ce}	3,26	3,45	16

Os valores médios do conteúdo em ADN nuclear (em pg) para cada *taxon* assim como o respectivo desvio padrão estão indicados na tabela, assim como o valor máximo e mínimo e o número de indivíduos analisados (n). As médias seguidas da mesma letra (a, b c ou d) não são significativamente diferentes entre si ($P \leq 0,05$), de acordo com o teste de comparação múltipla Tukey.

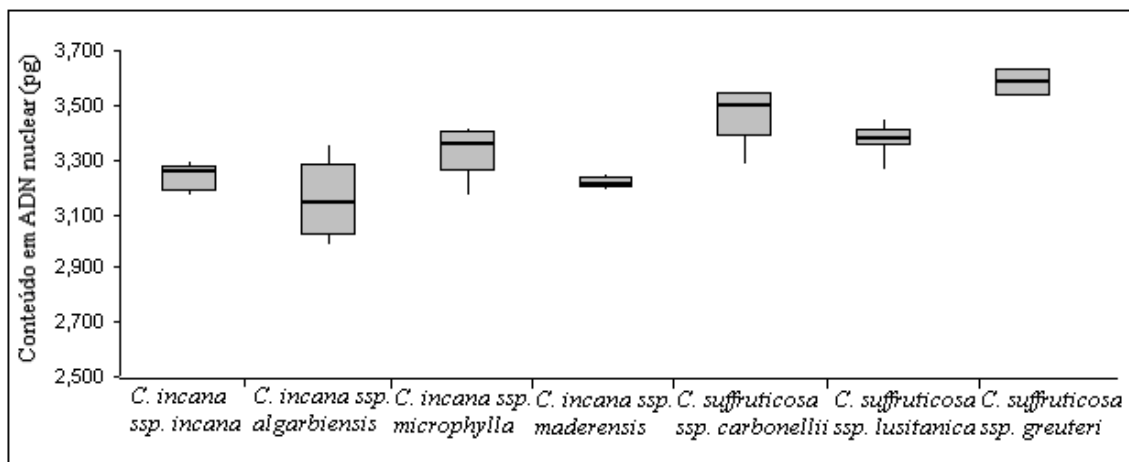


Figura 15- Representação gráfica do conteúdo em ADN nuclear dos *taxa* *Calendula incana* e *Calendula suffruticosa*. Os valores encontram-se distribuídos por 4 áreas de igual frequência (quartis), o conjunto de valores compreendidos entre o 1º e o 3º quartis encontram-se representados por um rectângulo (caixa) com a mediana indicada por uma linha horizontal, as duas linhas adjacentes indicam os extremos inferior e superior dos valores.

CAPÍTULO 4. Discussão

4.1. Índice mitótico

Em relação ao índice mitótico, os valores obtidos neste trabalho em *Calendula suffruticosa* subsp. *lusitanica* são concordantes com o valor 6,7% encontrado em *C. arvensis* e *C. officinalis* (Malallah & Brown 1999, Romeo & Căpraru 2008). Estes resultados são importantes, principalmente para os estudos cariológicos, também executados neste estudo. Aconselha-se portanto, para este género, recolher os vértices vegetativos cerca das 8 h, embora esta colheita se possa, também, fazer a qualquer hora no período entre as 8h e as 18h, com resultados apenas ligeiramente inferiores.

4.2. Número cromossómico

Os números cromossómicos encontrados são concordantes com os valores mais citados na bibliografia. Neste estudo não foram encontrados cromossomas satélite, no entanto, devido à sua natureza inconstante, pode-se afirmar que é possível que estes sejam encontrados noutras populações dos *taxa* presentemente estudados. De facto, já foi reportado a existência de cromossomas satélite em *C. incana* subsp. *algarbiensis* (Strother & Watson 1997) e em *C. tripterocarpa* (Oberprieler & Vogt 1993, Vogt & Oberprieler 2008). A verificação da existência de cromossomas satélite pode ser importante principalmente na confirmação de variabilidade intra-específica, quando estaé detectada por outra técnica, como por exemplo FCM.

4.3. Conteúdo em ADN nuclear

O conteúdo em ADN nuclear em *Calendula* foi, com este estudo, determinado pela primeira vez por FCM. Estima-se que o género *Calendula* tenha um conteúdo em ADN nuclear médio de 3,70 pg/2C, variando entre 5,66 pg/2C em *C. arvensis* e 2,98 pg/2C em *C. officinalis*.

Neste estudo foi detectada uma percentagem elevada (8,48%) de variação entre as populações de *C. arvensis* analisadas. As três populações analisadas encontram-se distantes geograficamente, no entanto, apenas a população de Pujairé apresenta valores significativamente distintos das outras duas populações. A variabilidade intra-específica deve ser analisada com precaução. A complexidade fito-química em *Calendula* deve ser um factor a ter atenção em estudos de citometria de fluxo. De facto, compostos citológicos podem comprometer as estimativas do conteúdo em ADN nuclear, provocando falsas diferenças. No entanto, neste estudo, foram tomadas precauções como por exemplo, para além do mesmo citómetro, também foi sempre utilizado o mesmo padrão de referência interno, analisado em simultâneo com as amostras de conteúdo desconhecido. No caso da população de *C. arvensis* de Portugal, Oiã, (*P Silveira* 3020), as estimativas do conteúdo em ADN nuclear foram realizadas em 3 dias distintos. O mesmo não foi possível realizar nas duas populações restantes de *C. arvensis*, porém, novos ensaios deverão ser realizados de forma a verificar a consistência dos resultados obtidos até ao momento.

A variação intra-específica do tamanho do genoma é um assunto controverso, visto que o valor de C é considerado como constante para cada espécie (*Garcia et al.* 2008). Alguns autores conseguiram relacionar com sucesso algumas diferenças intra-específicas a erros metodológicos ou identificações erradas de *taxa* (*Greilhuber* 2005). No entanto, outros autores conseguiram provar a existência de mudanças adaptativas no tamanho do genoma em resposta, por exemplo, a ambientes não favoráveis (*Cullis* 2005). Em *Hordeum spontaneum*, onde testaram o tamanho do genoma de populações diferentes ecológica e geograficamente, encontraram uma variação de 5% (*Turpeinem et al.* 1999). Em outro estudo, sobre diferenças de conteúdo em ADN nuclear entre populações geograficamente isoladas de *Sesleria albicans*, apesar de encontrarem uma diferença de apenas 1,6%, esta foi estatisticamente significativa (*Lysák et al.* 2000). Assim como em *Armeria maritima*, onde a variação do tamanho do genoma em 7% foi relacionada com a origem geográfica (*Vekemans et al.* 1996).

Sabe-se que vários mecanismos moleculares podem ser responsáveis pela diminuição ou aumento do conteúdo em ADN nuclear, como, duplicações, deleções, polimorfismos cromossómicos, a presença de cromossomas B ou a presença de sequências repetitivas

(Greilhuber 1998), o que torna possível que o valor de C , embora seja bastante constante, permita um determinado grau de variabilidade (Garcia *et al.* 2006).

A variabilidade intra-específica do valor de C pode ser considerada, em alguns casos, de valor taxonómico significativo, uma vez que tal variação no conteúdo em ADN nuclear pode ser indicativo de isolamento reproductivo e diversificação morfológica (Bennet & Leitch 2005b). Neste estudo, porém, é necessário sublinhar que *C. arvensis* possui uma distribuição bastante ampla, para além de ser uma espécie bastante polimórfica (Fernandes & Queirós 1971a, Heyn *et al.* 1974, Baltisberger & Widmer 2006). Como apenas foram analisadas três populações dentro do vasto leque de populações de *C. arvensis* existentes na Península Ibérica, não devem ser feitas extrapolações do significado taxonómico dos resultados obtidos. No entanto, seria pertinente a continuação da análise desta espécie, alargado-a a mais populações da Península Ibérica e efectuando estudos do número e estrutura dos cromossomas em representantes das várias populações.

Como é possível observar, o *taxon* ibérico com maior número cromossomático ($2n = 44$), *C. arvensis*, é também o que apresenta um maior conteúdo em ADN nuclear (5,66 pg/2C). O conteúdo em ADN nuclear, usualmente, aumenta com o número cromossomático (Soliman 2003). Existem vários artigos que defendem existir uma correlação positiva entre o número cromossomático e o conteúdo em ADN nuclear (Papaver, Srivastava & Lavania 1991; Achillea, Dabrowska 1992). No entanto, esta correlação nem sempre é observada. Como é o caso de *C. tripterocarpa*, apesar de ser o *taxon* estudado com o menor número cromossomático ($2n = 30$), apresenta o segundo maior conteúdo em ADN nuclear (3,54 pg/2C). A associação destes dois factores, número cromossomático diferente dos restantes *taxa* e um conteúdo em ADN nuclear também proporcionalmente diferente constituem uma indicação de que, possivelmente, esta espécie representa uma linha evolutiva distinta das restantes. Existem alguns exemplos, dentro do grupo Asteraceae, de espécies que apresentam um conteúdo em ADN nuclear diferente do que seria de esperar, tendo em consideração o número cromossomático. Por exemplo, *Artemisia abrotanum* que apresenta um conteúdo em ADN nuclear de 5,78 pg, enquanto outra espécie de *Artemisia* (*A. leucodes*), com o

mesmo número cromossómico, tem 15,39 pg (Garcia *et al.* 2004). Outro exemplo é o caso de *Siebera pungens* com o valor 2C de 16,98 pg e $2n = 20$ e *Amphoricarpus neumayeri* com 1,73 pg e $2n = 24$ (Garnatje *et al.* 2004).

Embora o conteúdo em ADN nuclear e a poliploidia apresentem entre si uma correlação positiva, o tamanho do genoma monoploide (Cx) possui a tendência de diminuir com o aumento do nível de ploidia (Bennet & Leicht 2005b, Loureiro *et al.* 2007a). De facto, *C. arvensis*, *taxon* estudado com maior nível de ploidia, apresenta o menor tamanho de genoma monoploide (1,46 pg). Este fenómeno encontra-se reportado em vários géneros, como por exemplo *Artemisia* (Garcia *et al.* 2004, 2008) e *Festuca* (Loureiro *et al.* 2007a).

Ainda analisando o tamanho do genoma monoploide em *Calendula*, verifica-se que as espécies anuais apresentam um valor de Cx significativamente inferior ($P < 0,001$) o que *C. incana* e *C. suffruticosa*. O mesmo resultado é obtido comparando o tamanho do genoma holoploide entre *taxa* com o mesmo número cromossómico, foi encontrado um valor de 2C significativamente inferior ($P < 0,001$) no *taxon* anual *C. officinalis* (2,96 pg) em relação a *C. incana* (3,26 pg) e *C. suffruticosa* (3,42 pg). De facto, é geralmente assumido que um conteúdo em ADN nuclear baixo está correlacionado com uma elevada taxa de desenvolvimento, ou seja, quanto menor for a quantidade de ADN nuclear a duplicar, mais rápido será o ciclo celular e o ritmo de desenvolvimento será, consequentemente, mais intenso também. Esta característica torna-se especialmente útil em plantas anuais, cujo ciclo de vida é menor (Garcia *et al.* 2004). Estes autores também registaram um valor 2C menor em *Artemisia scoparia*, uma planta anual, do que em outras espécies perenes do mesmo género.

Adicionalmente, é interessante notar que *C. officinalis*, o *taxon* com menor conteúdo em ADN nuclear, é a única espécie cultivada deste género. Em Garcia *et al.* (2006), foram comparadas populações selvagens de *Artemisia arborescens* com populações cultivadas desta espécie. Estes autores chegaram à conclusão que as populações cultivadas têm um menor conteúdo em ADN, sugerindo que o processo de cultivo possa ter conduzido a

uma diminuição do conteúdo em ADN nesta espécie. Anteriormente, Nagato *et al.* (1981) e Yamamoto & Nagato (1984) reportaram a existência de uma diminuição do conteúdo em ADN nuclear do arroz e da soja em cultivares, comparativamente com a espécie selvagem.

Apesar da indicação de Suda *et al.* (2003) de que nos arquipélagos da Macaronésia existem pressões que actuam favorecendo valores de 2C baixos, neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre o conteúdo em ADN nuclear de *C. incana* subsp. *maderensis* (*taxon* endémico da Madeira), em relação aos outros *taxa* da mesma espécie. Em Garcia *et al.* (2006) também não foram detectadas diferenças significativas entre populações continentais e insulares de *Artemisia arborescens*, reforçando a noção que o tamanho do genoma é normalmente constante dentro de espécies. No entanto, neste estudo apenas foi analisada uma população de um *taxa* dos arquipélagos da Macaronésia. Para ser possível efectuar alguma conclusão sobre o efeito da insularidade em *Calendula*, seria necessário, e também interessante, aumentar o número de populações de *C. incana* subsp. *maderensis* e estender a análise a outras populações de *taxa* existentes nos arquipélagos da Macarronésia.

C. incana e *C. suffruticosa* são *taxa* taxonomicamente complexos. Alguns autores consideram-os como duas espécies distintas (Ohle 1974), no entanto, outros autores, como Meikle (1976) na *Flora Europaea*, decidiram juntar estes dois *taxa* numa única espécie denominada *C. suffruticosa*. Torna-se assim importante a comparação do conteúdo em ADN nuclear entre os dois *taxa*, uma vez que ambos possuem o mesmo número cromossómico, $2n = 32$. Numa análise geral, verifica-se que estes *taxa* possuem um conteúdo em ADN nuclear semelhante. Quando analisados mais minuciosamente os *taxa* da Península Ibérica incluídos dentro de *C. incana* e *C. suffruticosa*, é possível detectar dois *taxa*: *C. incana* subsp. *microphylla* (com 3,33 pg/2C) e *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* (3,38 pg/2C) que poderão servir de elo de ligação entre as espécies correspondentes. De facto, a descrição morfológica dos *taxa* realizada por Ohle (1974) conduz, por vezes, a dúvidas e a alguma indecisão na altura da identificação. Por outro lado, as populações estudadas de *C. suffruticosa* subsp.

lusitanica encontram-se geograficamente próximas de regiões onde ocorrem e de onde foram utilizadas amostras de *C. incana* subsp. *microphylla*. Sabe-se também que é usual a ocorrência de hibridização entre espécies do género (Weddle 1941, Janaki-Ammal & Sobti 1962, Heyn & Joel 1983). Torna-se, portanto, compreensível a existência de um gradiente de transição, no que diz respeito aos respectivos conteúdos em DNA, entre os dois *taxa*. No entanto, recentemente foram analisadas amostras de *C. suffruticosa* subsp. *suffruticosa* (P Silveira 3038), provenientes da localidade clássica de onde este *taxon* foi descrito e observou-se que possui um conteúdo em ADN nuclear de aproximadamente 3,25 pg/2C. Estes resultados inferiores ao valor médio obtido para as amostras ibéricas de *C. suffruticosa*, denunciam uma maior conectividade entre os *taxa* *C. suffruticosa* e *C. incana* do que a inicialmente prevista. Revelando, relativamente ao conteúdo em ADN nuclear, um distanciamento de *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii* e *C. suffruticosa* subsp. *greuteri* que apresentam valores significativamente ($P \leq 0,05$) maiores que os restantes *taxa* deste grupo (*C. suffruticosa* e *C. incana*).

A variação encontrada no conteúdo em ADN nuclear poderá estar relacionada com uma resposta adaptativa a variações geográficas. No entanto, apenas foi estudada uma população de *C. suffruticosa* subsp. *greuteri* e poucas amostras de duas regiões próximas de *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii*. Propõem-se, portanto, novas análises a mais populações destes *taxa*, preferencialmente de regiões geográficas distintas.

4.4. Considerações finais

Neste estudo as contagens cromossômáticas foram limitadas às espécies definidas. No entanto, devido à variação encontrada em algumas populações específicas de certos *taxa*, como é caso da população de *C. arvensis* de Espanha, Pujairé (P Silveira 2979), seria útil, se possível, a realização de contagens específicas para estas populações de forma a verificar se as diferenças encontradas estão, por exemplo, associadas à existência de cromossomas satélite.

Relativamente ao seu conteúdo em ADN nuclear, os *taxa* anuais encontram-se perfeitamente delimitados. Foi possível observar um menor tamanho do genoma monoploide (Cx) nestes *taxa* quando comparados com outros *taxa* de ciclo de vida mais longo. No entanto, seria importante determinar o nível de ploidia da espécie *C.*

tripterocarpa, de modo possibilitar conclusões mais completas sobre os *taxa* anuais em *Calendula*. Em *C. arvensis* verificou-se a existência de variabilidade intra-específica, embora sejam necessárias mais análises, quer a mais representantes das populações estudadas, como a novas populações deste *taxa*.

Em relação aos *taxa* *C. incana* e *C. suffruticosa*, verifica-se que ambos possuem conteúdos em ADN semelhantes, embora, a última espécie apresente valores superiores aos da primeira, sobretudo, devido aos valores mais elevados de dois *taxa* *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii* e *C. suffruticosa* subsp. *greuteri*, ambos da região oriental da Península Ibérica. De facto, é interessante notar, que os *taxa* com maior conteúdo em ADN nuclear deste estudo, tanto anuais como perenes, se encontram bastante próximos entre si, na região mais oriental da Península Ibérica. Persiste alguma dúvida se os valores próximos e algo intermédios obtidos para *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* e *C. incana* subsp. *microphylla* serão correctos e indicarão o carácter de transição entre *C. incana* e *C. suffruticosa* destas duas subespécies, ou se deverão a defeitos de amostragem.

Seria, também, bastante interessante alargar o estudo a outros *taxa* e também a novas populações fora da Península Ibérica. No entanto, seria provavelmente esclarecedora a análise de *taxa* como *C. stellata* e *C. maroccana*, *taxa* que se situam na região considerada como o centro primário de evolução deste género.

Considera-se que, com este trabalho se conseguiu reunir informação citológica relevante para consolidar o conhecimento existente das relações taxonómicas entre os *taxa* do género *Calendula* que ocorrem na Península Ibérica. No entanto, evidenciou algumas novas questões que, se futuramente devidamente investigadas, poderão contribuir para uma melhor compreensão deste interessante género e fornecer bases sólidas para uma revisão taxonómica aprofundada do género *Calendula* L.

CAPÍTULO 5. Referências Bibliográficas

- Albers F, Pröbsting W. 1998. Chromosomenatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. Em: Wisskirchen R, Haeupler H (eds.) Standardliste der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. Stuttgart: Bundesamt für Naturschutz & Verlag. pp. 562–616.
- Aparicio A (1989) Números Cromosómicos de Plantas Occidentales. Anales Jard. Bot. Madrid, 452:483-494.
- Arumuganathan K, Earle E D (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Mol. Biol. Reporter, 9: 229-241.
- Baltisberger M, Huber W (1987) Chromosome number report. Int. Organ. Pl. Biosyst. Newslett. (Zurich), 9: 4-5.
- Baltisberger M, Widmer A (2006) Chromosome numbers of plant species from the Canary Islands. Bot. Helv., 116: 9-30.
- Bennet M D (1998) Plant genome values: How much do we know? Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 2011-2013.
- Bennet M D, Bahndol P, Leitch I (2000) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their morden uses: 807 estimates. Ann. Bot., 86: 859-909.
- Bennet M D, Leitch I J (2005a) Angiosperm DNA C-values Database (versão 6, Outubro 2005): <http://www.kew.org/values/homepage.html>.
- Bennet M D, Leitch I J (2005b) Genome size evolution in plants. Em: Gergory T R (ed.) The evolution of the genome. Dordrecht, Elsevier Academic Press. pp. 90-164.
- Bennet M D, Leitch I J (2005c) Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. Ann. Bot., 95: 45-90.
- Borgen L (1975) Chromosome Numbers of Vascular Plants from Macaronesia. Norw. J. Bot., 22: 70-76.
- Borgen L (1974) Chromosome Numbers of Macaronesian flowering plants II. Norw. J. Bot., 21: 195-210.
- Bowell G P (1985) Use of tissue cultures for studies on vascular differentiation. Em: Dixon R A (ed.) Plant cell culture. A practical approach. Oxford, CRC Press. pp. 117.
- Carr G D, King R M, Powell A M, Robinson H (1999) Chromosome numbers in Compositae. XVIII. Amer. J. Bot., 86 (7): 1003-1013.
- Côrte-Real M, Sansonetty F, Ludovico P, Prudêncio C, Rodrigues F, Fortuna M, Sousa M J, Silva M T, Leão C (2002) Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. Boletim de Biotecnologia, 71: 19-33.
- Cronquist A (1981) An integrated system of classification of flowering plants. Nova Iorque, Columbia University Press.
- Cullis A C (2005) Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax. Ann. Bot., 95: 201-206.
- Dabrowska J (1992) Chromosome number and DNA content in *taxa* of *Achillea* L. in relation to the distribution of the genus. Prace Bot. Univ. Wroclawski, 49: 1-84.

- Dahlgren R, Karlsson T, Lassen P (1971) Studies in the flora of the Balearic Islands. I. Bot. Notiser, 124: 249-269.
- Dalgaard V (1986) Chromosome Studies in Flowering Plants from Macaronesia. Anales Jard. Bot. Madrid, 43 (1): 83-111.
- Darlington C D, La Cour L F (1976) The Handling of Chromosomes, 6ª edição. Plymouth, George Allen & Unwin Ltd. pp. 19-40.
- Darlington C D, Wylie A P (1955) Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2ª edição. Londres, Allen and Undwind Ltd. pp. 266.
- Diaz Linfante Z, Luque T, Santa Barbara C (1992) Chromosome numbers of plants collected during Iter Mediterraneum. Bocconeia, 3: 229-250.
- Doležel J (1997) Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. J. Appl. Genet., 38: 285-302.
- Doležel J, Bartoš J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Ann. Bot., 95: 99-110.
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry, 51A: 127-128.
- Doležel J, Binarová P, Lucretti S (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biol. Plant., 31: 113-120.
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák M A, Nardi L, Obermayer R (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. Ann. Bot., 82: 17-26.
- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometry cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. Physiol. Plant., 85: 625-631.
- Ehrendorfer F (1970) Mediterran-mitteeuropäische Florenbeziehungen im Lichte cytotaxonomischer Befunde. Feddes Repert., 81: 3-32.
- Fedorov (1969) Chromosome numbers of flowering plants. Leningard. pp. 77.
- Fernandes A, Queirós M (1971a) Contribution à la connaissance cytotaxonomique des Spermatophyta du Portugal. Bol. Soc. Brot., 45 (2): 5-21.
- Fernandes A, Queirós M (1971b) Sur la caryologie de quelques plantes récoltées pendant la III Reunion de Botanique Péninsulaire. Mem. Soc. Brot., 21: 343-385.
- Flora Iberica*- Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares: <http://www.floraiberica.es>. Consultado a 25 de Maio de 2009.
- Galbraith D W, Harkins K R, Maddox J M, Ayres N M, Sharma D P, Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometry analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science, 220: 1049-1051.
- Galbraith D, Lambert G, Macas J, Doležel J (2002) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. Current Protocols in cytometry. Eds. Robinson J, Azmi A, Tutois S. Nova Iorque, John Wiley & Sons. Em Loureiro & Santos (2004).
- Gallego M J (1983) Nota sobre las especies españolas del género *Calendula* L. Lagasalia, 12: 131-132.

- Garcia S, Canela, M Á, Garnatje T, McArthur E D, Pellicer J, Sanderson S C, Vallès J (2008) Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Bio. J. Linn. Soc.*, 94: 631-649
- Garcia S, Garnatje T, Twibell J D, Vallès J (2006) Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and its cultivars. *Genome*, 49: 244-253.
- Garcia S, Sanz M, Garnatje T, Kreitschitz, McArthur E D, Vallès J (2004) Variation of DNA amount in 47 populations of the subtribe Artemisiinae and related taxa (Asteraceae, Anthemideae): Karyological, ecological and systematic implications. *Genome*, 47: 1004-1014.
- Gardocki M E, Zablocki H, El-Keblawy A, Freeman D C (2000) Heterocarpy in *Calendula micrantha* (Asteraceae): The effects of competition and availability of water on the performance of offspring from different fruit morphs. *Evolution Ecology Research*, 2: 701-718.
- Garnatje T, Vallès J, Garcia S, Hidalgo O, Sanz M, Canela, M A, Siljak-Yakovlev S (2004) Genome size in *Echinops* L., and related genera (Asteraceae, Cardueae): karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biol. Cell*, 96: 117-124.
- Goldblatt P, Johnson D E (Eds.) (1979) Index to plant chromosome numbers. St. Louis, Missouri Botanical Garden.
- Greilhuber J (2005) Intraspecific variation of genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann. Bot.* 95: 91-98.
- Greilhuber J (1998) Intraspecific variation in genome size: A critical reassessment. *Ann. Bot.*, 82: 27-35.
- Greilhuber J, Doležel J, Lysák M A, Bennet M D (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot.*, 95: 255-260.
- Gupta P K (1969) Cytological Investigations in Some Indian Compositae. *Cytologia*, 34 (3): 429-438.
- Gupta P K, Agarwal D K, Srivastava A K (1972) Further Cytological Investigations in Indian Compositae. *Cytologia*, 37: 581-593.
- Gupta R C, Gill B S (1989) Cytopalynology of North and Central Indian Compositae. *J. Cytol. Genet.*, 24: 96-105.
- Heller F O (1973) DNA-measurement of *Vicia faba* L. with pulse cytophotometry. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 86 (5-9): 437-441.
- Heyn C C (1988) Investing in adaptations to rare events a reproductive strategy. *Lagascalia*, 15: 29-36.
- Heyn C C, Dagan O, Nachman B (1974) The annual *Calendula* species: Taxonomy and Relationships. *Israel J. Bot.*, 23: 169-201.
- Heyn C C, Joel A (1983) Reproductive relationships between annual species of *Calendula* (Compositae). *Pl. Syst. Evol.*, 143: 311-329.
- Heywood V H (ed.) (1993) Flowering plants of the World. Londres, B T Batsford Ltd.
- Humphries C J, Murray B G, Bocquet G, Vasudevan K (1978) Chromosome Numbers of Phanerogams from Morocco and Algeria. *Bot. Notiser*, 131: 391-406.
- Jahier J, Tanguy A M (1992) Observation des chromosomes. Techniques de base: Mitoses. Em: Jahier (ed.) Techniques de Cytogénétique végétale. Paris, INRA. pp. 7-9.

- Janaki-Ammal E K, Sobti S N (1962) Chromosome relationships in *Calendula* species. Proc. Ind. Acad. Sci., 155: 128-130.
- Koller D, Roth N (1964) Studies of the ecological and physiological significance of amphicarpy in *Gymnarrhena micrantha* (Compositae). Am. J. Bot., 51: 26-35.
- Lanza D (1919) Monografia del genere *Calendula* L. Atti R. Acad. Sci. Palermo, 11.
- Loureiro J, Doležel J, Greilhuber J, Santos C, Suda J (2008) Plant Flow Cytometry- Far beyond the Stone Age. Cytometry, 73A: 579-580.
- Loureiro J, Kopecký D, Castro S, Santos C, Silveira P (2007a) Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* spp. Plant Syst. Evol., 269: 89-105.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C (2007b) Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry – a test with 37 species. Ann. Bot., 100: 875-888.
- Loureiro J, Santos C (2004) Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. Boletim de Biotecnologia, 77: 18-29.
- Löve A, Kjellqvist E (1974) Cytotaxonomy of Spanish Plants. IV. Dicotyledons: Caesalpiniaceae – Asteraceae. Lagasalia, 4 (2): 153-211.
- Lysák M A, Rostková A, Dixon J M, Rossi G, Doležel J (2000) Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. Ann. Bot., 86: 399-403.
- Májovský J (1978) Index of Chromosome Numbers of Slovakian Flora (Part 6). Acta Facul. Rerum. Nat. Univ. Comen., Bot., 26 (1): 1-42.
- Malallah G A, Brown G (1999) Determination of chromosome numbers of Kuwaiti Flora. I. Cytologia, 64: 181-196.
- Marchi P, Capineri R, D'Amato G (1974) Numeri Cromosomici per la Flora Italiana. Inform. Bot. Ital., 6: 303-319.
- Marie D, Brown S (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biol. Cell, 78: 41-51.
- Martín Ciudad A (1991) Números cromosómicos de plantas vasculares ibéricas. Archivos de Flora Iberica. 1. Madrid, Real Jardín Botánico, ICYT, CSIC.
- Mathew A, Mathew P M (1988) Cytological studies on the south Indian Compositae. Glimpses in plant research, 8: 1-177.
- Mehra P N, Gill. B S, Mehta J K, Sidhu S S (1965) Cytological investigations on the Indian Compositae. I. North-India *Taxa*. Caryologia, 8 (1): 35-68.
- Mehra P N, Remanadan P (1976) Cytological Investigations on Indian Compositae. V. Tribes: Artotideae. Cynareae. Calenduleae and Mutiseae. The Nucleus, 19 (i): 8-12.
- Meikle R D (1976) *Calendula* L. Em: Tutin T G, Heywood V H, Burges N A, Valentine D H, Walters S M, Webb D A (eds) Flora Europaea, vol 4 - Plantaginaceae to Compositae. Cambridge, Cambridge University Press. pp. 206-207.
- Mesquita Rodrigues J E (1953) Contribuição para o conhecimento cariológico das halófitas e psamófitas litorais. pp. 142-162.

- Meusel H, Ohle H (1966) Zur taxonomie und cytologie der gattung *Calendula*. Österr. Bot. Z., 113 (2): 191-210.
- Moore D M (1968) The karyotype in taxonomy. Em: Heywood V H (ed.) Modern methods in plant taxonomy. Londres, Academic Press. Botanical Society of the British Isles, The Linnean Society of London. pp. 61-75.
- Murin A (1997) Karyotaxonomy of some medicinal and aromatic plants. Thaiszia, 7: 75-88. (não consegui ter acesso)
- Murin A (1993) Karyological study of the ornamental plants of the Slovak flora. Biologia (Bratislava), 48: 441-445.
- Nagato Y, Yamamoto K, Yamashita H (1981) Variation of DNA content in Asian rice. Jpn. J. Genet., 56: 483-493.
- Negodi G (1936) Contributo alla carilogia del genero *Calendula* L. Rendc. Acad. Lincei.. cl. Sci. Fis. Mat. Nat., 23: 88-91.
- Nordenstam B (1996) Recent revision of Senecioneae and Calenduleae systematics. Em: Hind D J N, Beentje H J (eds.) Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference. Kew. 1994. Kew, Royal Botanic Gardens. pp. 591-596.
- Nordenstam B (1994) Tribe Calenduleae. Em: Bermer K (ed.) Asteraceae. Cladistics & Classification. Portland, Timber Press. pp. 365-376.
- Nordestam B (1972) Chromosome Numbers in Some Compositae from Egypt. Bot. Notiser, 125: 393-396.
- Norlindh T (1977) Calenduleae- Systematic review. Vol. 34. Em: Heywood M *et al.* (eds.) The biology and chemistry of the Compositae. Londres, Academic Press. pp. 961-987.
- Norlindh T (1963) Chromosome numbers in the Calenduleae L. With discussions on relationships. hybridization and phytogeography. Bot. Notiser, 116 (2): 193-209.
- Norlindh T (1946) Studies in the Calenduleae. II. Phytogeography and interrelation. Bot. Notiser, 4: 471-506.
- Norlindh T (1943) Studies in the Calenduleae. I. Monograph of the genera *Dimorphotheca*. *Castalis*. *Osteospermum*. *Gibbaria* and *Chrysanthemoides*. Lund., C. W. K. Gleerup.
- Oberprieler C, Vogt R (1993) Chromosome numbers of North African phanerogams. II. Willdenowia, 23: 211-238.
- Ohle H (1974) Beiträge zur taxonomie der gattung *Calendula*. II. Taxonomische revision der südeuropäischen perennierenden Calendula-Sippen. Feddes Repert., 85 (4): 245-283.
- Ohle H (1975a) Beiträge zur taxonomie und evolution der gattung *Calendula*. III. Revision der marokkanischen perennierenden Sippen unter Berücksichtigung einiger marokkanischer Annueiler. Feddes Repert., 86 (1-2): 1-17.
- Ohle H (1975b) Beiträge zur taxonomie der gattung *Calendula*. IV. Revision der algerisch-tunesischen perennierenden *Calendula*-Sippen unter berücksichtigung einiger marokkanisch-algerischer annueiler und der marokkanischen und südeuropäischen perennierenden. Feddes Repert., 86 (9-10): 525-541.

- Ohri D (1998) Genome size variation and plant systematics. *Ann. Bot.*, 82 (1): 75-83.
- Otto F J (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. In: Darzynkiewicz Z, Crissman H A (eds) *Methods in cell biology*, vol. 33. San Diego, Academic Press. pp. 105-110.
- Pastor Díaz J (1997) *Atlas cromosómico de la flora vascular de Andalucía Occidental*. Sevilla, Universidade de Sevilla.
- Pawlowski B, Jasiewicz A (eds.) (1971) *Flora Polska*, Vol. 12. Warsaw-Krakow.
- Pfossen M, Amon A, Lelley T, Heberle-Bors E (1995) Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21: 387-393.
- Pogan E, Jankun A, Sawicka Z (1989) Further Studies in Chromosome Numbers of Polish Angiosperms (Part 22). *Acta Biol. Cracov., Bot.*, 31: 1-17.
- Pogan E, Wcislo H (1990) Chromosome numbers of polish angiosperms. *Acta Biol. Cracov., Bot.*, 32: 1-169.
- Powell A M, Kyhos D W, Raven P H (1974) Chromosome numbers in Compositae. X. *Amer. J. Bot.*, 61: 909-913.
- Press J R, Short M J (eds) *Flora of Madeira*. Londres, Natural History Museum, HMSO. pp. 360-361.
- Price H, Johnston J (1996) Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: Jauhar P (ed.) *Methods of genome analysis in plants*. Boca Raton, Nova Iorque, Londres, Tóquio, CRC Press. pp 115-131.
- Queirós M (1973) Contribuição para o conhecimento citotaxonomico das spermatophyta de Portugal. *Bol. a Soc. Brot.*, 47 (2): 299-315.
- Rashid A (1974) Chromosome numbers of some Mediterranean plants. *Bangladesh J. Bot.*, 3: 75-82.
- Romeo C M, Căpraru G (2008) Influence of sodium phosphate (E339) on mitotic division in *Calendula officinalis* L. *Analele Științifice ale Universității "Alexandru Ioan Cuza", Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*, 9: 81-84.
- Ruiz de Clavijo E (2005) The reproductive strategies of the heterocarpic annual *Calendula arvensis* (Asteraceae). *Acta Oecologica*, 28: 119-126.
- Ruiz de Clavijo E (1989) Números cromosomáticos de plantas occidentales, 619-630. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 47 (2): 431-437.
- Scrugli A (1974) Numeri per la flora italiana: 190-195. *Inform. Bot. Ital.*, 6: 37-43.
- Singh R J (2002) *Plant Cytogenetics*. 2ª edição. Boca Raton, CRC Press. pp. 7-18.
- Silveira M A M, Villela F A, Tillmann M A A (2002) Maturação fisiológica de sementes de *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) *Revista Brasileira de Sementes*, 24 (2): 31-37.
- Snow R (1963) Alcoholic hydrochloric acid-carmin as a stain for chromosomes in squash preparations. *S. T.*, 38: 9-13.
- Soliman M I (2003) Genetic diversity of achene heteromorphism in Egyptian *Calendula micrantha* Tineo et Guss. *Asian J. Plant Sci.*, 2 (10): 782-789.

- Sorensen A A (1978) Somatic polymorphism and seed dispersal. *Nature*, 276: 174-176.
- Srivastava S, Lavania U C (1991) Evolutionary DNA variation in *Papaver*. *Genome*, 34: 763-768.
- Strother J L, Watson L E (1997) Document of chromosome numbers 1997. I. Chromosome numbers in Compositae from Morocco and Spain. *Sida*, 17 (3): 627-629.
- Suda J, Kyncl T, Freiová R (2003) Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. *Ann. Bot.*, 92: 153-164.
- Tanguy A M, Eber F (1992) Observation des chromosomes. Techniques de base: Méioses. Em : Jahier (ed.) *Techniques de Cytogénétique végétale*. Paris, INRA. pp. 36-40.
- Talavera S (1979) Numeros Cromosomicos para la Flora Española. *Numeros* 84-120. *Lagascalia*, 9 (1): 115-130.
- Temsch E M, Greilhuber J, Hammett K R W, Murray B G (2008) Genome size in *Dahlia* Cav. (Asteraceae-Coreoideae). *Plant Syst. Evol.*, 276: 157-166.
- Turpeinen T, Kulmala J, Nevo E (1999) Genome size variation in *Hordeum spontaneum* populations. *Genome*, 42: 1094-1099.
- Van Loon J C (1974) A Cytological Investigation of Flowering Plants from the Canary Islands. *Acta Bot. Neerl.*, 23 (2): 113-124.
- Vekemans X, Lefèbvre C, Coulaud J, Blaise S, Gruber W, Siljak-Yakovlev S, Brown S C (1996) Variation in nuclear DNA content at the species level in *Armeria maritima*. *Hereditas*, 124: 237-242.
- Vieira M C, Gomes H E, Sangalli A, Heredia Z, Teixeira I R, Ramos M B M (2006) Crescimento e produção de biomassa de calendula (*Calendula officinalis* L.) proveniente de dois tipos de diásporos e duas colorações de capítulos florais. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 8 (4): 193-197.
- Vogt R, Aparicio A (1999) Chromosome numbers of plants collected during Iter Mediterraneum IV in Cyprus. *Bocconeia*, 11: 117-169.
- Vogt R, Oberprieler C (2008) Chromosomes numbers. VIII. More counts in Compositae. *Willdenowia*, 38: 497-519.
- Weddle (1941) A species hybrid of *Calendula*. its F2 population and its tetraploid. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 39: 393-396.
- Yamamoto K, Nagato Y (1984) Variation of DNA content in the genus *Glycine*. *Jap. J. Breed.*, 38: 470-473.

ANEXO

Tabela com os valores de conteúdo em ADN nuclear (pg/2C) para os vários taxa de *Calendula* com respectiva identificação do número de herbário (AVE) e localização.

Espécie	Nº de herbário	Localização	Conteúdo em ADN nuclear (pg/2C)
<i>Calendula arvensis</i>	2979	Espanha: Andaluzia, Almeria, Pujaire.	6,47
			6,59
			6,52
	3020	Portugal: Beira Litoral, Oliveira do Bairro, Águas Boas.	5,20
	3021	Portugal: Beira Litoral, Aveiro.	5,53
<i>Calendula arvensis</i> subsp. <i>macroptera</i>	2985	Espanha: Andaluzia, Sevilha, Alcalá de Guadaire.	5,56
			5,64
			5,31
<i>Calendula incana</i> subsp. <i>incana</i>	2937b	Espanha: Andaluzia, Cádiz, Tarifa.	3,25
			3,20
			3,27
			3,17
			3,38
<i>Calendula incana</i> subsp. <i>algarbiensis</i>	2898	Portugal: Baixo Alentejo, Sines, Porto Côvo.	3,04
			3,26
	2902	Portugal: Algarve, Vila do Bispo, Cabo de São Vicente.	3,35
			3,07
	3033	Portugal: Algarve, Vila do Bispo, Sagres.	2,99
<i>Calendula incana</i> subsp. <i>madeirensis</i>	MS5676	Portugal: Madeira; Ponta de S. Lourenço, Prainha.	3,29
			3,20
			3,22
			3,25
			3,19
<i>Calendula incana</i> subsp. <i>microphylla</i>	2939	Portugal: Estremadura, Porto de Mós, Alvados.	3,21
			3,25
	2940	Portugal: Estremadura, Cadaval, Serra de Montejunto.	3,26
			3,26
	2976	Espanha: Galiza, Pontevedra, Praia de Lanzada.	3,38
			3,33
	3025	Portugal: Estremadura, Cadaval; Serra de Montejunto.	3,41
			3,41
			3,35
	3027	Portugal: Estremadura, Peniche, Ilha Berlenga.	3,41
			3,37
			3,37
	3029	Portugal: Beira Litoral, Figueira da Foz, Serra da Boa Viagem junto ao Farol.	3,41
			3,29
	8A	Portugal: Estremadura, Sintra, Praia Grande.	3,17
			3,24
<i>Calendula officinalis</i>	2986b	Portugal: Beira Litoral, Aveiro, Oiã.	3,00
	2986c	Portugal: Ribatejo, Abrantes, Alvega.	3,15
			2,93
			3,02

	3053	Portugal: Beira Litoral, Aveiro.	2,92 2,94 2,91 2,94 2,92
<i>Calendula suffruticosa</i> subsp. <i>carbonellii</i>	2937c	Espanha: Andaluzia, Nerja, Maro.	3,33 3,51
	2983	Espanha: Andaluzia, Granada, Cerro Gordo.	3,41 3,55 3,49
	3036	Espanha: Andaluzia, Granada, Cerro Gordo.	3,55
<i>Calendula suffruticosa</i> subsp. <i>greuteri</i>	3046	Espanha: Andaluzia, entre Salobreña e Velez de Benadalla, no início do canhão do rio Gualdafeio.	3,63 3,53
<i>Calendula suffruticosa</i> subsp. <i>lusitanica</i>	3015	Portugal: Estremadura, Sintra.	3,34 3,38 3,40 3,35 3,42 3,39 3,26 3,37
	3016	Portugal: Estremadura, Sintra, São Pedro de Sintra.	3,38
	3017	Portugal: Estremadura, Sintra, pe. Galamares.	3,42
	3023	Portugal: Estremadura, Sintra, Fontanelas.	3,45 3,42 3,35 3,40 3,35 3,37
<i>Calendula tripterocarpa</i>	2982	Espanha: Andaluzia, Almeria, Tabernas.	3,54 3,60 3,62 3,53 3,49

Cariossistemática do género *Calendula* L. (Asteraceae) na Península Ibérica

Sofia Vilaça Nora



Mestrado em Ecologia, Biodiversidade e Gestão de Ecossistemas
Orientado por Prof. Paulo Silveira e Prof. Conceição Santos

Introdução

Enquadramento do estudo

Revisão taxonómica do género *Calendula* L. para *Flora Iberica*

Autores:

Paulo Silveira

(Departamento de Biologia,
Universidade de Aveiro)

Santiago Castroviejo

(Real Jardín Botánico de Madrid,
CSIC)



www.floraiberica.org

Introdução

Objectivos

Determinar, para os *taxa* pertencentes ao género *Calendula* que ocorrem na Península Ibérica:

- o número cromossomático,
- o conteúdo em ADN nuclear.

Este estudo pretende contribuir para uma melhor compreensão das relações cariológicas e taxonómicas entre os *taxa* que ocorrem na Península Ibérica de forma a fornecer bases sólidas para uma correcta classificação do género.

Introdução

Família Asteraceae
Tribo *Calenduleae*



Norlindh (1977)

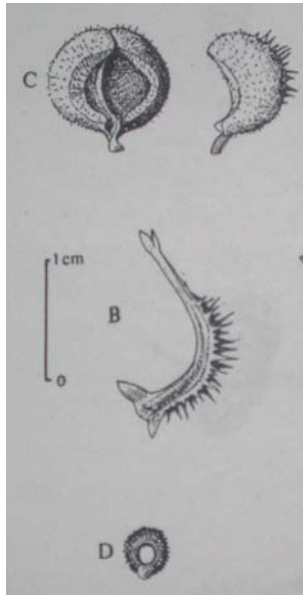


10-25 espécies consoante o autor

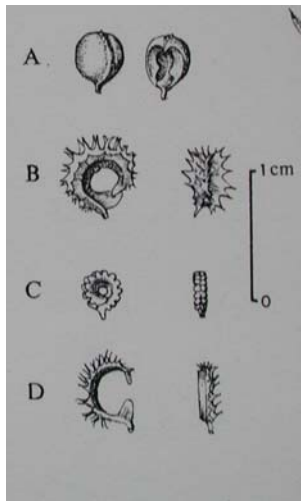
Introdução

Género taxonomicamente complexo
Grande variabilidade

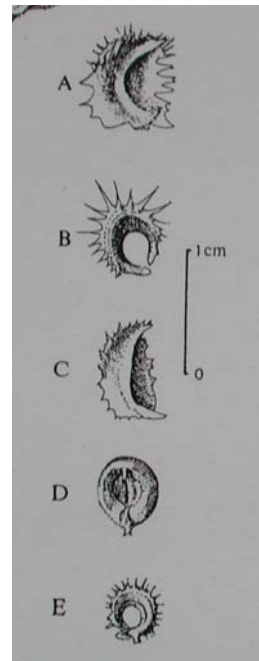
Calendula L.



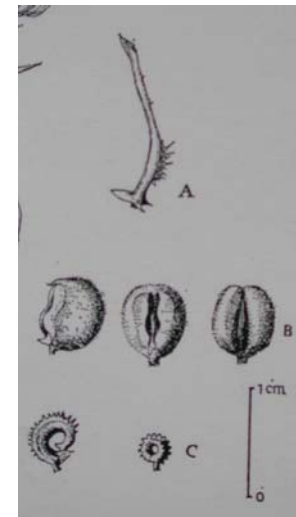
forma *arvensis*



forma *sinaica*



forma *alata*



forma *sancta*

Calendula arvensis L.

Heyn *et al.* 1974

Introdução

Calendula L.

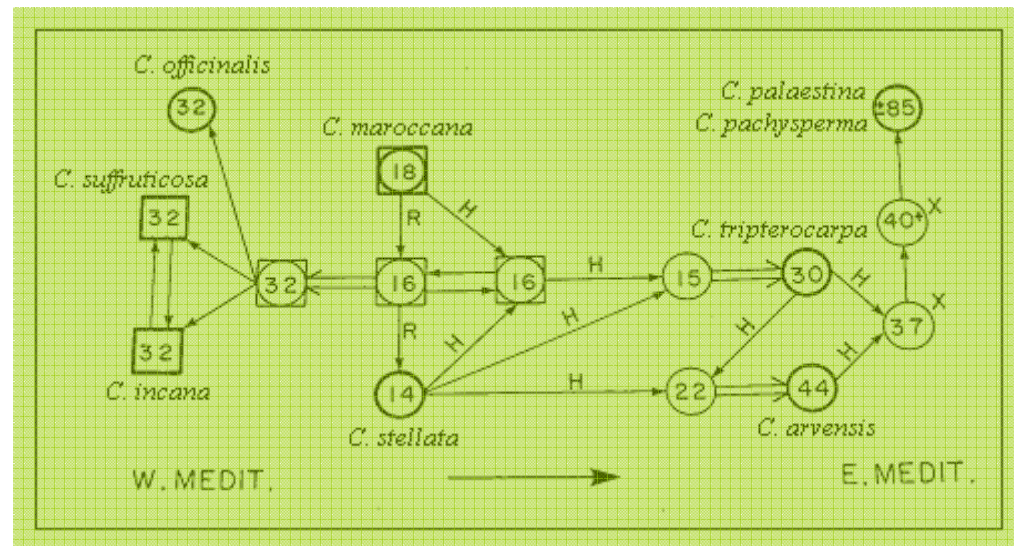
Diferentes abordagens ao estudo deste género

Norlindh 1946, Meusel & Ohle 1966

Recentemente

Heyn *et al.* 1974

Ohle 1974, Ohle 1975a e b



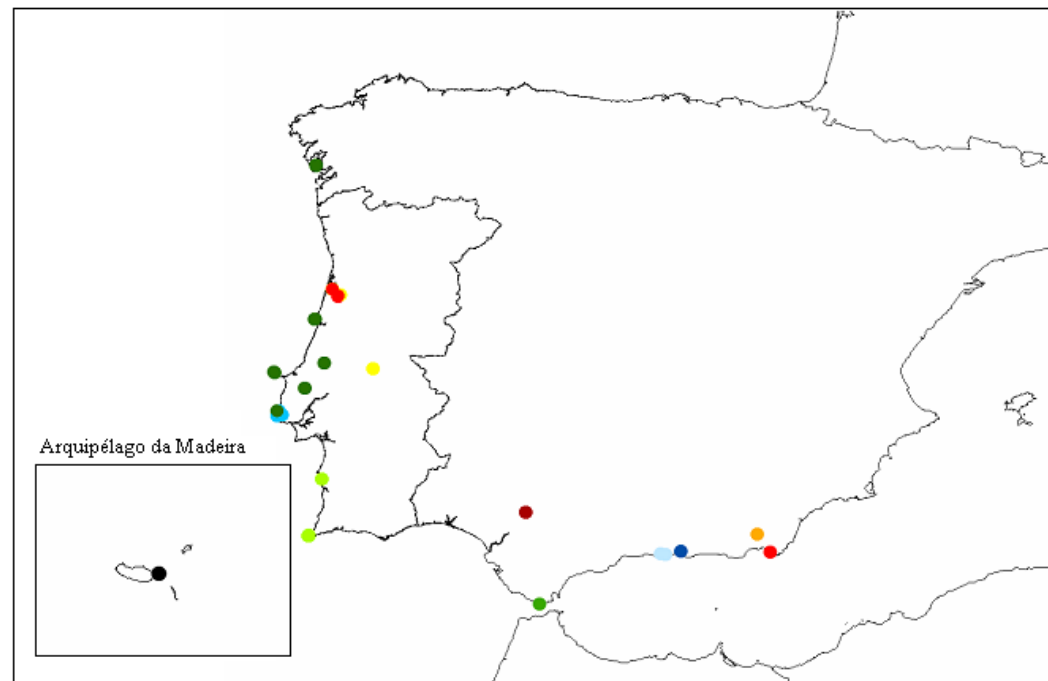
Heyn & Joel 1983

Material e Métodos

Material Vegetal

- 11 *taxa*
- 28 populações

Nomenclatura
→ Ohle (1974)



Escala de 1:5000000

Material e Métodos

Índice Mitótico

Material vegetal

→ Ápices radiculares de aquénios germinados em placas de Petri

Metodologia

Cada 2 h durante 14 horas.

→ **Bowell 1985**

$\text{N}^\circ \text{ de células em divisão} / \text{N}^\circ \text{ total de células}$

Material e Métodos

Número cromossomático

Material vegetal

- Ápices radiculares de aquénios germinados ou plantas adultas
- Botões florais de plantas adultas

Metodologia

- Aparicio 1989

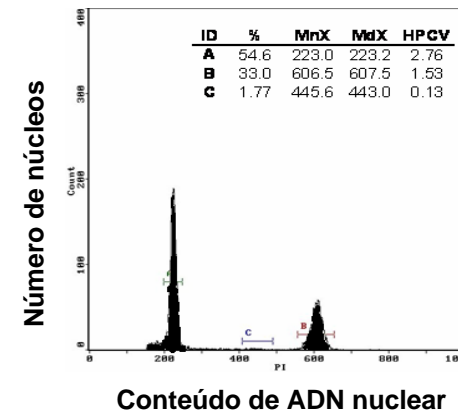
Pré-tratamento: Água fria (0 – 2°C)

Fixação: Carnoy I = Etanol absoluto:Ácido acético glacial
(3:1)

Coloração: Carmim clorídrico alcoólico

Material e Métodos

Conteúdo em ADN nuclear



Conteúdo em ADN nuclear (pg)

$$= \frac{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ } Calendula \text{ sp.}}{\text{Média do pico } G_0/G_1 \text{ do padrão interno} \times \text{conteúdo em ADN do padrão interno}}$$

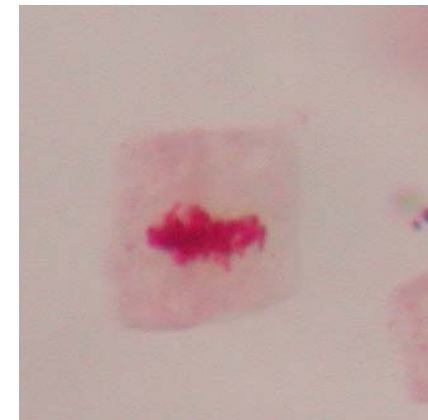
Loureiro & Santos 2004

Resultados e Discussão

Índice mitótico

C. suffruticosa subsp. *lusitanica*

Horas	Índice mitótico (%)
6	2,67 \pm 0,44*
8	6,28 \pm 1,07
10	3,57 \pm 0,13
12	4,34 \pm 0,32
14	4,46 \pm 1,01
16	4,47 \pm 2,00
18	3,18 \pm 0,41*
20	2,50 \pm 0,31*



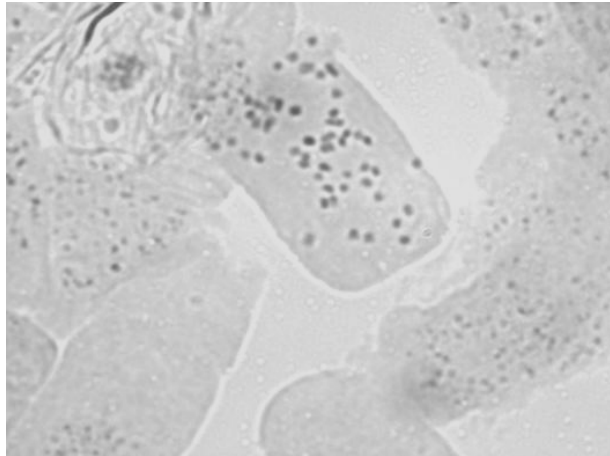
6% para *C. arvensis* e *C. officinalis*
(Malallah & Brown 1999, Romeo & Căpraru 2008)

* diferenças significativas ($P \leq 0,05$) com o pico de actividade

Resultados e Discussão

Número cromossomático

C. arvensis



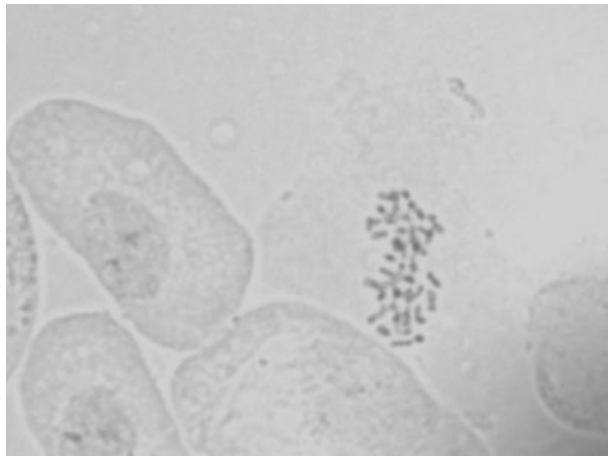
$$2n = 44$$

Taxa	Número Cromossomático reportado		
	n	2n	Referências
<i>C. arvensis</i>		14	Humphries <i>et al.</i> 1978
		18	Humphries <i>et al.</i> 1978
		36	Negodi 1936, 1936, 1937, Janaki-Ammal & Sobti 1962, Pawlowski & Jasiewicz 1971, Malallah & Brown 1999
		42	Borgen 1974, Löve & Kjellqvist 1974, Albers & Probsting 1998
	22		Heyn & Joel 1983, Aparicio 1989
		44	Meusel & Ohle 1966, Dahlgren <i>et al.</i> 1971, Fernandes & Queirós 1971a, Nordestam 1972, Queirós 1973, Heyn <i>et al.</i> 1974, Marchi <i>et al.</i> 1974, Powell <i>et al.</i> 1974, Scrugli 1974, Van Loon 1974, Borgen 1975, Diaz Lifante <i>et al.</i> 1992, Oberprieler & Vogt 1993, Malallah & Brown 1999, Vogt & Aparicio 1999, Baltisberger & Widmer 2006, Vogt & Oberprieler 2008
<i>C. arvensis</i> subsp. <i>macroptera</i>		44	Gallego 1983

Resultados e Discussão

Número cromossômico

C. incana



C. incana subsp. *microphylla*

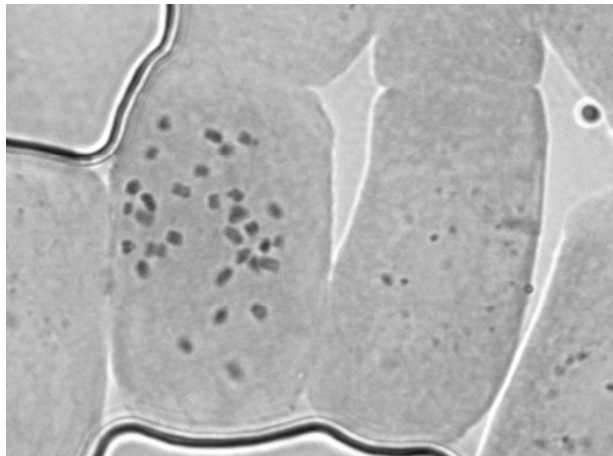
2n = 32

Taxa	Número Cromossômico reportado		
	n	2n	Referências
<i>C. incana</i>		18	Meusel & Ohle 1966
subsp. <i>incana</i>			
	16		Heyn & Joel 1983, Ruiz de Clavijo 1989
		32	Ohle 1974, Vogt & Oberprieler 2008
<i>C. incana</i>		32	Ohle 1974, Strother & Watson 1997
subsp.			
<i>algarbiensis</i>			
<i>C. incana</i>		32	Meusel & Ohle 1966, Ohle 1974, Press & Short 1994
subsp.			
<i>maderensis</i>			
<i>C. incana</i>		20	Fernandes & Queirós 1971b
subsp.			
<i>microphylla</i>			
		32	Mesquita Rodrigues 1953, Meusel & Ohle 1966, Fernandes & Queirós 1971a, Queirós 1973

Resultados e Discussão

Número cromossômático

C. officinalis



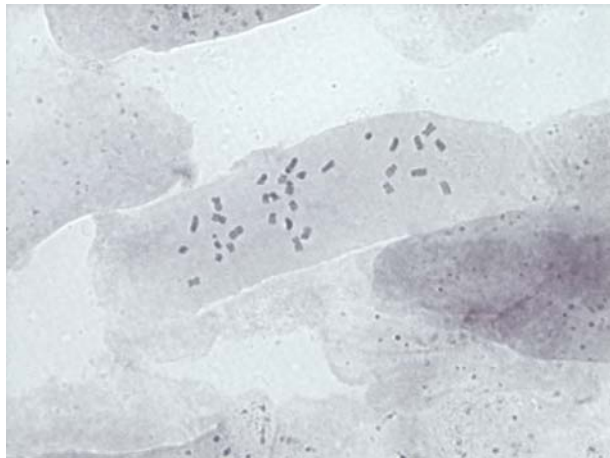
$$2n = 32$$

Taxa	Número Cromossômático reportado		
	n	2n	Referências
<i>C. officinalis</i>		14	Carr <i>et al.</i> 1999
		28	Negodi 1936, Májovský <i>et al.</i> 1978, , Murin 1993
	16		Mehra <i>et al.</i> 1965, Gupta 1969, Gupta <i>et al.</i> 1972, Mehra & Remanandan 1976, Heyn & Joel 1983, Mathew & Mathew 1988
		32	Weddle 1941, Janaki-Ammal & Sobti 1962, Meusel & Ohle 1966, Ohle 1974, Baltisberger & Huber 1987, Gupta & Gill 1989, Pogan <i>et al.</i> 1990, Pogan & Wcislo 1990, Murin 1997

Resultados e Discussão

Número cromossômico

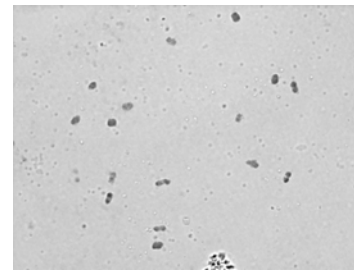
C. suffruticosa



C. suffruticosa subsp. *lusitanica*

$2n = 32$

Número Cromossômico reportado			
Taxa	n	2n	Referências
<i>C. suffruticosa</i>		32	Ohle 1974
subsp. <i>carbonellii</i>			
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>greuteri</i>		32	Ohle 1974
<i>C. suffruticosa</i> subsp. <i>lusitanica</i>	16		Talavera 1979
		32	Meusel & Ohle 1966, Fernandes & Queirós 1971a, Ohle 1974, Meikle 1976



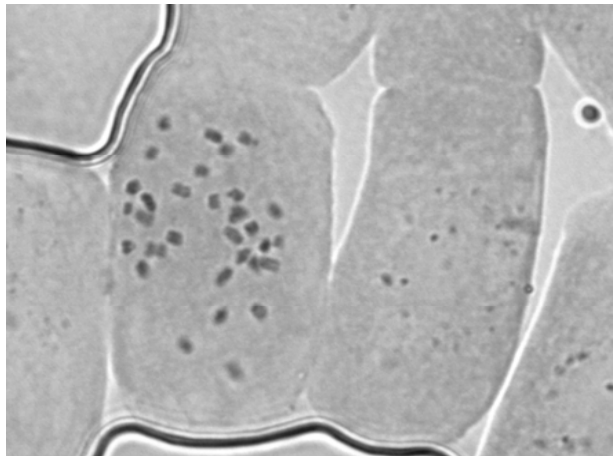
$n = 16$

botão floral (antera)

Resultados e Discussão

Número cromossômático

C. tripterocarpa



$$2n = 30$$

Número Cromossômático reportado			
Taxa	n	2n	Referências
<i>C. tripterocarpa</i>	15		Aparicio 1989
		30	Meusel & Ohle 1966, Heyn <i>et al.</i> 1974 , Diaz <i>et al.</i> 1992
		30+2B	Oberprieler & Vogt 1993, Vogt & Oberprieler 2008
		54	Dalgaard 1986

Resultados e Discussão

Conteúdo em ADN nuclear

Taxa	2n	Nº de pop.	Conteúdo em ADN nuclear				n
			2C (pg)	Cx (pg)	Nível de ploidia	CV (%)	
<i>C. arvensis</i> L.	44	4	5,66 ± 0,48	1,46	4	3,55	14
<i>C. officinalis</i> L.	32	3	2,96 ± 0,08	1,48	2	3,86	9
<i>C. tripterocarpa</i> Rupr.	30	1	3,54 ± 0,06	-	-	3,32	5
<i>C. incana</i> Willd.	32	13	3,26 ± 0,11	2,99	2	3,87	29
<i>C. suffruticosa</i> Vahl	32	8	3,42 ± 0,09	3,26	2	3,52	24

→Correlação positiva entre o conteúdo em ADN nuclear e o número cromossomático (Soliman 2003)

→Correlação negativa entre o valor Cx e o nível de ploidia (Bennet & Leicht 2005, Loureiro *et al.* 2007)

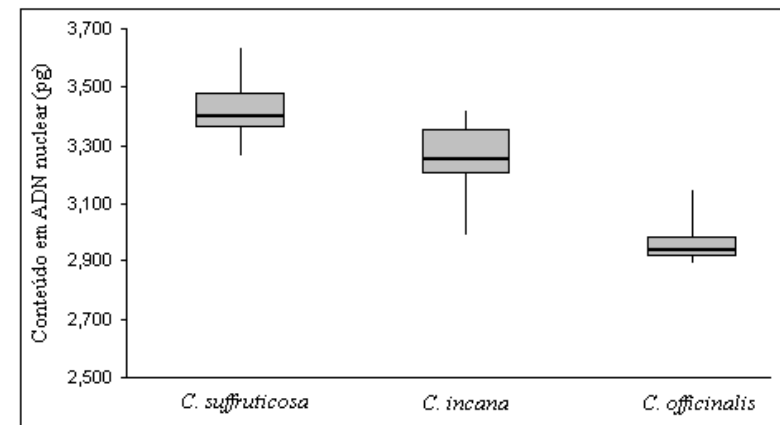
Resultados e Discussão

Conteúdo em ADN nuclear

Taxa	2n	Nº de pop.	Conteúdo em ADN nuclear				n
			2C (pg)	Cx (pg)	Nível de ploidia	CV (%)	
<i>C. arvensis</i> L.	44	4	5,66 ± 0,48	1,46	4	3,55	14
<i>C. officinalis</i> L.	32	3	2,96 ± 0,08	1,48	2	3,86	9
<i>C. tripterocarpa</i> Rupr.	30	1	3,54 ± 0,06	-	-	3,32	5
<i>C. incana</i> Willd.	32	13	3,26 ± 0,11	2,99	2	3,87	29
<i>C. suffruticosa</i> Vahl	32	8	3,42 ± 0,09	3,26	2	3,52	24

→ **Taxa anuais com menor valor Cx**
(Garcia *et al.* 2004)

→ **Espécie cultivada com menor conteúdo em ADN nuclear**
(Garcia *et al.* 2006)



Taxa com 2n = 32

Resultados e Discussão

Conteúdo em ADN nuclear

Variabilidade intra-específica de 8,5%

C. arvensis

População de <i>C. arvensis</i>	Conteúdo em ADN nuclear	
	2C (pg)	n
Espanha, Pujairé (P <i>Silveira</i> 2979)	6,53 ± 0,06*	3
Portugal, Oia (P <i>Silveira</i> 3020)	5,39 ± 0,09	7
Espanha, Alcalá de Guadaire (P <i>Silveira</i> 2985)	5,50 ± 0,17	3

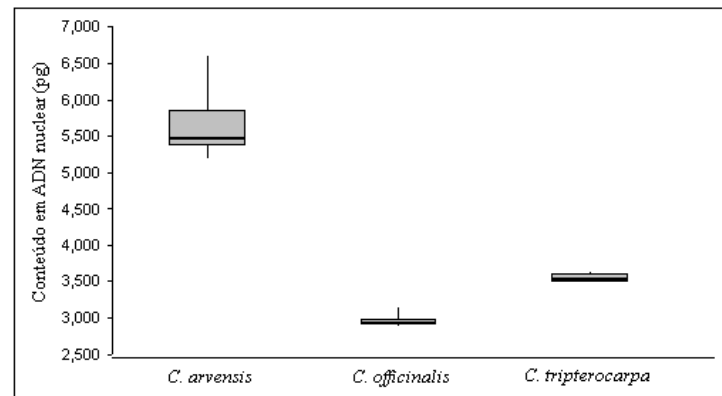
* diferenças altamente significativas ($p < 0,001$)

→ Valor taxonómico (Bennet & Leitch 2005)

Resultados e Discussão

Conteúdo em ADN nuclear

Taxa anuais

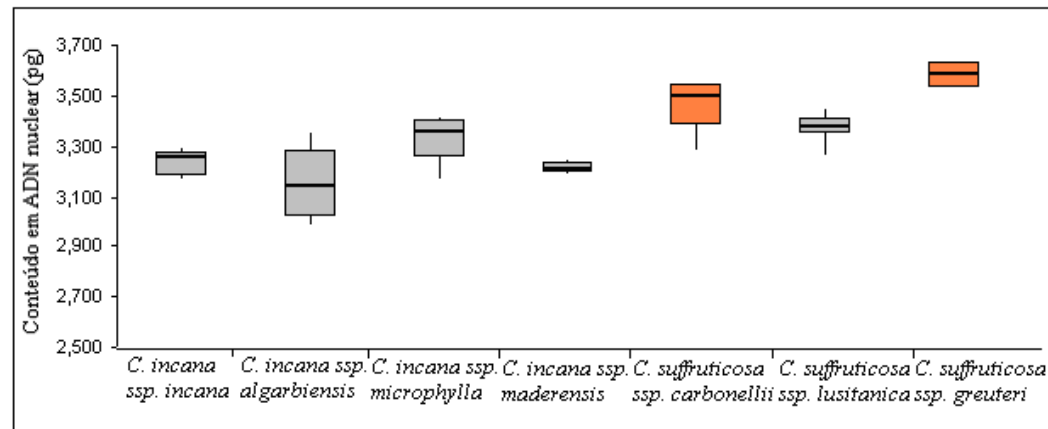


Conteúdo em ADN nuclear perfeitamente diferenciável entre si

Resultados e Discussão

Conteúdo em ADN nuclear

C. suffruticosa e *C. incana*



→ *C. suffruticosa* subsp. *carbonellii* (3,47 pg) e *C. suffruticosa* subsp. *greuteri* (3,58 pg)

→ *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* (3,38 pg) e *C. incana* subsp. *microphylla* (3,33 pg)

Conclusões

- Números cromossómicos observados são concordantes com bibliografia.
- Primeira referência ao conteúdo em ADN nuclear para o género.
- Encontrou-se uma variabilidade intra-específica elevada em *C. arvensis*.
- Verificou-se que os *taxa* anuais possuem um conteúdo em ADN nuclear perfeitamente distinto entre si.

Conclusões

- Observa-se que *C. suffruticosa* e *C. incana* possuem conteúdos em ADN semelhantes.
 - Dois *taxa* com valores significativamente superiores: *C. suffruticosa* subsp. *carbonelli* e *C. suffruticosa* subsp. *greuteri*.
- Verifica-se que os *taxa* estudados com maior conteúdo em ADN nuclear encontram-se na região sudeste da Península Ibérica.
- Considera-se que seria interessante alargar o estudo a *taxa* e populações fora da Península Ibérica, especialmente aos *taxa* *C. stellata* e *C. maroccana*, que se situam na região considerada como centro primário de evolução deste género.

Conclusões

Este estudo evidenciou algumas novas questões que, se no futuro forem devidamente investigadas, poderão contribuir para uma melhor compreensão deste interessante género e fornecer bases sólidas para uma revisão taxonómica aprofundada do género *Calendula*.



Obrigada pela vossa atenção!